

國立臺灣大學生物資源及農學院農藝學系

碩士論文

Department of Agronomy

College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

鉀與水稻鎘逆境關係之研究

Studies on the relationship between potassium and

cadmium stress of rice seedlings



劉純馨

Chun-Hsin Liu

指導教授：高景輝 教授

Advisor: Ching Huei Kao, Professor

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

誌謝

記得大四第一次敲高老師的門，坐在大圓桌旁跟老師談了許久，感覺老師一切都幫我想好了。大五開始正式進入實驗室做實驗，奕婷學姐親切的微笑，跟我說：學妹，不要緊張！老師走進實驗室看到我，總會問問：做實驗好不好玩啊？以前大學總覺得進入實驗室是無法想像的另一個人生階段，現在一晃眼，已經近三年了！

謝謝高老師近三年來的指導，不僅給我機會學習實驗技巧，學習如何做研究，也教導我做實驗的心態，特別實驗遇到瓶頸的時候，您總是鼓勵我繼續做下去。對於人生的規劃，當初休學兩年參加訓練，特別這一年多來花了許多做實驗、寫論文的時間準備出國留學，謝謝您的包容，所給予的仍是關心和扶持。

謝謝四位口試委員，陳宗禮老師、王恆隆老師、洪傳揚老師和許奕婷老師，謝謝你們在烈日下，百忙中抽空前來，對於論文給予許多寶貴的建議。感謝農藝系的盧虎生老師和常玉強老師，在我準備出國的事上給予許多關心和建議。還有黃文達老師，謝謝老師在分析元素含量時給予許多幫助。謝謝人工氣候室提供場所及設備，使所有實驗能夠順利完成。

感謝奕婷學姐在我剛進實驗室時，一步步帶我做實驗，大學作專討實驗的時候遇到許多瓶頸，但在學姐的幫助下，所有的問題都迎刃而解。還有芙蓉學姐、登國學長和焯燁，在我大五這一年，謝謝你們在實驗上的幫助和陪伴。謝謝親切的雲洋學長，每一次走到學長的位子旁問問題，不論學長在做實驗或忙其他的事，總是放下手邊的事來幫助我，不厭其煩的教導我做實驗的態度和小細節。還有為實驗室增添不少歡樂的庭邵，碩一這一年來謝謝你在實驗上所有的關心和幫助，買了好多名產、蛋糕跟我們分享，還有一起享用布列德奶茶的日子。

即將一起畢業的仕珏、凡萱和婉容，謝謝你們這兩年來的陪伴和幫助。一起享用二十一世紀的炸雞，一起去新體游泳放鬆心情加減肥，一起討論系上必修課的作業和考試，一同分享做實驗、寫論文的技巧，一起規劃我們未來的人生。雖然這幾個月大家都在忙論文，相信口試完之後我們一定都會達到自己人生的「夢想」。

還有 214 實驗室乖巧的學弟學妹們，毅竹、怡萱、雲雁和宓妍，為實驗室增加不少活力和歡笑聲，也常常在我做實驗疲累的時候，貼心的遞上你們的小點心。

謝謝 FTT18 所有的同伴們，即使結訓後我們仍是一同奔跑屬天的賽程。訓練時候與你們一同奉獻禱告，結訓後在人生中經歷多次的挫折，是你們愛主的見證如同雲彩圍繞，使我脫去各樣的重擔，激勵我向前。所有前面看似艱難的環境，因為

與你們一同禱告，轉為神的祝福。

感謝父母所有的扶持，從小到大你們總是讓我自己規劃我的人生，大學選擇延畢一年，研究所先休學參加訓練，將來仍舊夢想到德國求學，謝謝你們總是尊重我的想法和自己的人生規劃，也總是在過程中為我禱告。

親愛的主耶穌，謝謝你在創世前的揀選和豫定，使我從小生在主的恢復裡，將來更要進榮耀裡去。雖然我向你的心常是刻變時翻，但是你的憐憫總是一再臨及我。謝謝你一步一步引領我，帶我進入高老師的實驗室，帶我完成碩士學位。在我人生所有的關口向我顯現，與我同在。「永遠的愛已愛我，這愛藉恩我賞識」。結訓後的兩年遇到許多挫折，但是每一次的環境，都是你作為化妝的恩典臨到我。即使德國留學夢經過五年還沒有實現，但是我深信你有美意不必測。

純馨 九十九年七月



中文摘要

本論文是以水稻品種台中在來 1 號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1) 或台農 67 號 (*Oryza sativa* L. cv. Tainung 67, TNG67) 為材料，探討 (一) 缺鉀與水稻鎘逆境關係之研究與 (二) 鎘毒害對水稻幼苗吸收鉀離子之影響。

缺鉀處理之 TN1 水稻幼苗，其第二片葉片、地上部和地下部之鉀含量均明顯下降，幼苗外觀較對照植物矮小，並且第二片葉片有黃化現象。缺鉀葉片之 H_2O_2 含量增加並且抗氧化酵素 superoxide dismutase (SOD)、ascorbate peroxidase (APX)、glutathione reductase (GR)、catalase (CAT) 之活性提升。若處理 NADPH oxidase 之抑制劑，imidazole (IMD)，能顯著降低缺鉀所誘導之 H_2O_2 含量增加和抗氧化酵素 SOD、APX、GR、CAT 活性之提升，顯示缺鉀所誘導之 H_2O_2 含量之增加是藉由 NADPH oxidase 之活化，並且抗氧化酵素 SOD、APX、GR、CAT 活性之提升，是經由 H_2O_2 所調控。缺鉀導致水稻幼苗葉片脫落酸 (ABA) 含量上升，並且 ABA 之合成抑制劑，tungstate 能降低缺鉀所誘導 ABA 和 H_2O_2 含量增加，並且降低缺鉀所誘導抗氧化酵素 SOD、APX、GR、CAT 活性之提升，顯示缺鉀所誘導之 H_2O_2 含量增加可能是經由 ABA 累積所致。缺鉀之水稻幼苗經後續鎘處理，發現鎘毒害減緩，由於缺鉀水稻幼苗之鎘含量並未減少，顯示缺鉀幼苗對於後續鎘逆境之保護作用，不是藉由降低對鎘之吸收，而是經由抗氧化酵素 SOD、APX、GR、CAT 活性之提升。

TN1 和 TNG67 之水稻幼苗，經後續鎘處理 6 天，鎘毒害在 TN1 較 TNG67 為顯著，顯示 TN1 為不耐鎘之品種，TNG67 為耐鎘之品種。TN1 幼苗鎘含量遠高於 TNG67，並且 TN1 之鉀含量在鎘處理下顯著下降，但在 TNG67 幼苗並沒有顯著影響，說明 TN1 所受到之鎘毒害，可能是由於鉀含量下降所致。後續以鎘與鉀同時

處理 TN1 水稻幼苗，發現能減緩鎘毒害，進一步證實 TN1 所受到之鎘毒害，可能是由於鉀含量下降所致。

關鍵字：鉀、鎘、水稻



ABSTRACT

In this study, rice [*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1 (TN1) or cv. Tainung 67 (TNG67)] were used as test materials to investigate (a) the interaction between cadmium (Cd) and potassium (K) deficiency and (b) the effect of Cd on K uptake in rice seedlings.

It was found that K deprivation in nutrient solution significantly decreased K concentration in shoots, leaves, and roots of rice seedlings, and K-deficient rice seedlings appeared stunting with chlorosis in the second leaves comparing to control seedlings. H₂O₂ content in leaves and roots of rice seedlings increased under K deficiency. Similarly, the activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), and catalase (CAT) increased under K deficiency, whereas the contents of ascorbate and glutathione were not affected. Imidazole (IMD), an inhibitor of NADPH oxidase, reduced the increase in H₂O₂ content and SOD, APX, GR, and CAT activities under K deficiency. IMD is an inhibitor of NADPH oxidase which catalyzes H₂O₂ generation, suggesting that NADPH oxidase is a H₂O₂ generating enzyme in K-deficient leaves. Our results also suggest that the increase in SOD, APX, GR and CAT activities under K deficiency is mediated through H₂O₂. In addition, abscisic acid (ABA) contents increased in leaves of rice seedlings grown under K deficiency. Treatment with tungstate, an inhibitor of ABA biosynthesis, also reduced K deficiency-induced H₂O₂ accumulation and increase of SOD, APX, GR, CAT activities. These results indicate that H₂O₂ accumulation in the second leaves is related to ABA under K deficiency.

For the subsequent Cd treatment, we found that Cd toxicity in K-deficient leaves was less pronounced than that in K-sufficient leaves, indicating that K deficiency protected from the subsequent Cd toxicity in rice seedlings. However, K-deficient rice seedlings didn't decrease Cd uptake, indicating that the protection of K deficiency from Cd toxicity in rice seedlings is unlikely due to the reduction of Cd uptake, and is more likely due to the increased activities of antioxidative enzymes.

We used two rice cultivars, TN1 and TNG67, cultivars with different sensitivity to Cd stress, to investigate the effect of Cd toxicity on K uptake. TN1 rice cultivar is Cd sensitive, while TNG67 is Cd insensitive. When rice seedlings were treated with CdCl₂, it was observed that Cd treatment resulted in a significant decrease in K concentration in TN1, but not in TNG67. In addition, Cd uptake in TN1 was five times higher than that in TNG67. These results suggest that cadmium toxicity of TN1 seedlings might be resulted from the decrease in K uptake. Therefore, we applied additional treatment of K and Cd at the same time to Cd-sensitive cultivar, TN1, and we found that Cd toxicity was decreased by additional K, which further supports the idea that Cd toxicity of TN1 is a result of subsequent reduction in K uptake.

Key words : K, Cd, rice

目錄

誌謝.....	ii
中文摘要.....	iv
ABSTRACT.....	vi
目錄.....	viii
圖目錄.....	x
表目錄.....	xi
縮寫字對照.....	xii
前言.....	1
前人研究.....	3
一、植物與氧化逆境.....	3
二、鉀與植物生長.....	5
三、缺鉀對植物生長之影響.....	7
四、無機離子缺乏對過氧化氫之影響.....	8
五、無機離子缺乏對 ABA 之影響.....	9
六、鎘污染.....	10
七、鎘對植物的影響.....	11
八、鎘對植物吸收離子之機制的影響.....	12
九、綜合逆境.....	13
十、研究室過去相關文獻探討.....	15
十一、論文研究方向.....	15
材料與方法.....	16
一、材料種植與處理.....	16
二、水耕液之配製.....	16
三、化學成份與基因表現分析.....	18
(一) 鉀含量測定.....	18
(二) 鎘含量測定.....	18
(三) 葉綠素含量測定.....	19
(四) 蛋白質含量測定.....	19
(五) 脂質過氧化作用測定.....	20
(六) 過氧化氫含量之化學分析.....	21
(七) ABA 含量測定.....	21
(八) AsA 與 DHA 含量測定.....	24
(九) GSH 與 GSSG 含量測定.....	25
四、酵素活性分析.....	27
(一) SOD 活性分析.....	27
(二) APX 活性分析.....	27

(三) GR 活性分析.....	28
(四) CAT 活性分析.....	28
五、 供試藥劑配置.....	29
六、 數據統計分析.....	29
結果.....	30
一、 鎘對缺鉀水稻幼苗之影響.....	30
二、 鎘毒害對水稻幼苗鉀離子吸收之影響.....	43
討論.....	50
一、 鎘對缺鉀水稻幼苗之影響.....	50
二、 鎘毒害對水稻幼苗吸收鉀離子之影響.....	56
三、 未來研究方向.....	57
參考文獻.....	58



圖目錄

圖 1. 植物細胞中清除 ROS 的主要途徑.....	5
圖 2. 水稻種子發芽後分別生長於缺鉀 (-K) 或不缺鉀(對照, Control)木村氏水耕液至第三葉完全展開後之外表型態。.....	31
圖 3. 缺鉀 (-K) 對水稻幼苗第二片葉片 (A) 地上部 (B)、及地下部 (C) 鉀含量之影響。.....	32
圖 4. 缺鉀 (-K) 對水稻幼苗第二片葉片 (A) 及地下部 (B) H ₂ O ₂ 含量之影響。.....	33
圖 5. 缺鉀 (-K) 對水稻幼苗第二片葉片抗氧化酵素 SOD (A)、APX (B)、GR (C)、CAT (D) 活性及抗氧化物 AsA (E)、DHA/AsA (F)、GSH (G)、GSSG/GSH (H) 與 GSSG (F) 含量之影響。.....	34
圖 6. 外加 IMD 處理對缺鉀 (-K) 水稻幼苗第二片葉片抗氧化酵素 SOD (A)、APX (B)、GR (C)、CAT (D) 活性之影響。.....	36
圖 7. 缺鉀 (-K) 對水稻幼苗第二片葉片脫落酸含量之影響。 <i>OsRab16A</i> 基因表現 (A) 與 ELISA 法 (B) 測定脫落酸含量。.....	37
圖 8. 外加 tungstate 處理對缺鉀 (-K) 水稻幼苗第二片葉片脫落酸含量之影響。 <i>OsRab16A</i> 基因表現 (A) 與 ELISA 法 (B) 測定脫落酸含量。.....	38
圖 9. 外加 tungstate 處理對缺鉀 (-K) 水稻幼苗第二片葉片 H ₂ O ₂ 含量 (A) 及抗氧化酵素 SOD (B)、APX (C)、GR (D)、CAT (E) 活性之影響。.....	39
圖 10. 缺鉀 (-K) 與氯化鎘處理對水稻幼苗外觀 (A) 與第二片葉片 MDA 含量 (B) 之影響。.....	41
圖 11. 缺鉀 (-K) 與氯化鎘處理對水稻幼苗地上部 (A) 及地下部 (B) 鎘含量之影響。.....	42
圖 12. 氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 及 TNG67 外觀 (A, B)、第二片葉片葉綠素 (C, D) 與 MDA 含量 (E, F) 之影響。.....	44
圖 13. 氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 及 TNG67 地上部 (A, C) 及地下部 (B, D) 鎘含量之影響。.....	45
圖 14. 氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 及 TNG67 第二葉 (A, D)、地上部 (B, E) 及地下部 (C, F) 鉀含量之影響。.....	47
圖 15. 氯化鉀與氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 第二片葉片 MDA (A) 與葉綠素 (B) 含量之影響。.....	48
圖 16. 氯化鉀與氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 地上部 (A, C) 與地下部 (B, D) 之鎘含量與鉀含量的影響。.....	49
圖 17. 缺鉀水稻幼苗減緩鎘毒害之機制。↓表示降低, ↑表示增加。.....	55

表目錄

表格 1. 正常水耕液之配方.....	17
表格 2. 缺鉀水耕液之配方.....	17
表格 3. ABA 含量測定之 ELISA 反應試劑配置方法.....	23
表格 4. RT-PCR 基因引子序列.....	24



縮寫字對照

縮寫名	全名
• OH	Hydroxide
ABA	Absciscic acid
APX	Ascorbate peroxidase
AsA	Ascorbate
ATPase	Adenosine triphosphatase
CAT	Catalase
CdCl ₂	Cadmium chloride
Dea	Diethanolamine
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DHA	Dehydroascorbate
DHAR	Dehydroascorbate reductase
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
DTT	Dithiothreitol
DW	Dry weight
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FW	Fresh weight
GR	Glutathione reductase
GSH	Reduced glutathione
GSSG	Oxidized glutathione
H ⁺	Hydrogen ion
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
IMD	Imidazole
-K	Potassium deficiency
LSD	Least significant difference
MAPK cascade	Mitogen-activated protein kinases cascade
MDA	Malondialdehyde
MDHA	Monodehydroascorbate
MDHAR	Monodehydroascorbate reductase
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form

NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
NSCC	Nonselective cation channel
O ₂	Oxygen
O ₂ ⁻ •	Superoxide
PNP	<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate disodium
PQ	Paraquat
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SAS	Statistical analysis system
SOD	Superoxide dismutase
SSA	Sulfosalicylic acid
TBA	Thiobarbituric acid
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloroacetic acid
Tea	Triethanolamine
TN1	Taichung Native 1
TNG67	Tainung 67
UV-B	Ultraviolet-B

前言

水稻屬禾本科作物，為世界三大糧食作物之一，其年產量超過 60 億公噸，僅次於玉米。全世界有三分之一以上的人口仰賴水稻為主食。近數十年來世界人口遽增，加上全球暖化、溫室效應等外在因素，水稻的需求量遠大於其產量，因此提高水稻產量及品質實為刻不容緩之需。

鉀為植物生長所需的大量元素之一，在植物之生理及代謝過程中均扮演重要的角色。土壤鉀素下降乃至虧缺，帶有普遍性問題。民國 60 年代中期以後，台灣各類瓜果菜類栽培技術改進，土壤則很快出現缺鉀，特別是南部高屏地區很突出地表現出普遍缺鉀現象。吳春才(2005)指出，土壤缺鉀其最根本的原因是違背了配方施肥的原則。忽視適度足量施肥，忽視有機肥的使用，氮、磷、鉀肥施用比例失調，或是耕作過度等等，而導致土壤中鉀素下降。

重金屬一般泛指密度大於 5.0 g cm^{-3} 之金屬，在元素週期表屬於過渡元素。鎘(cadmium, Cd)密度約為 8.6 g cm^{-3} ，歸類為重金屬之一。鎘在工業上經常被用來作鎳鎘電池、染料、塗料色素及製造塑膠之穩定劑。台灣首次爆發鎘米事件，主要是塑膠穩定劑工廠排放廢水至灌溉渠道污染農田所致。鎘較其他重金屬容易為農作物、蔬菜、稻米所吸收，並且鎘易蓄積於生物體內，太多的鎘堆積會造成人體近端腎小管損傷，久而容易形成軟骨症及自發性骨折，即所謂痛痛病(Itai-itai disease)(Nogawa & Kido, 1993)。

過去研究指出，鎘毒害會影響植物生長，甚至造成死亡，其主要的的原因是鎘會誘導活化氧族的產生，造成氧化逆境，並且鎘會影響植物對其他無機離子之吸收，

降低植物生長所需之大量元素及微量元素之含量，進一步抑制植物之生長發育 (Hasan *et al.*, 2009)。

作物在田間所遭受的逆境往往非單一逆境，而為多重逆境。Mittler 在 2006 年 (Mittler, 2006) 提出逆境間交互作用 (stress combination) 的概念，指出植物對於兩種逆境交互作用下的反應為獨一的，而非直接從植物對單一逆境的反應來推斷。植物同時遭遇多種逆境，可能會同時活化不同之訊息傳遞路徑 (stress-responsive signal transduction pathway)，而導致這些逆境對作物的影響有協同作用 (synergistic effect) 或對抗作用 (antagonistic effect)。

本研究室近年來亦開始著手於水稻幼苗於雙重逆境下的研究。水稻幼苗在高溫、缺氮或缺硫下伴隨鎘處理，會導致鎘所造成之氧化逆境更為嚴重 (Hsu & Kao, 2008; 林雅琳, 2008; 郭俊伶, 2008)。但水稻幼苗若於缺鎂伴隨鎘處理，反而能減緩鎘所誘導之氧化傷害 (周庭邵, 2009)。延續多重逆境之基礎概念，本論文欲探討於缺鉀情況下伴隨鎘處理，對水稻幼苗之影響，並探討鎘毒害對水稻幼苗鉀離子之吸收的影響。

前人研究

一、植物與氧化逆境

活化氧族 (reactive oxygen species, ROS) 為植物正常代謝中的一項中間產物。當氧分子接受電子，由基態 (ground state) 提升為激活態 (excited state) 時，便會形成活化氧族。主要的活化氧族包括超氧自由基 (O_2^-)、過氧化氫 (H_2O_2)，超氧自由基 ($\cdot OH$) 與單線態氧 (singlet oxygen, 1O_2) 等。植物若遭遇到非生物因子或生物因子所引起之逆境，便會誘導活化氧族在植物中大量形成。活化氧族會破壞細胞內的成分，如蛋白質、葉綠素等大分子 (Halliwell, 1987)，並會攻擊細胞膜上的脂質，產生 malondialdehyde (MDA)，造成脂質過氧化作用 (lipid peroxidation) (Charles & Halliwell, 1981)。目前研究已知土壤中過多的重金屬，如過量銅和鎘等金屬，會誘導過量的活化氧族在植物中形成，而造成氧化逆境 (Chen & Kao, 1999; Kuo & Kao, 2004)。

對於活化氧族所造成之氧化逆境，植物可經由抗氧化物或抗氧化酵素的建立，清除活化氧族，以減緩其對植物細胞的傷害。植物體內的抗氧化酵素主要為 superoxide dismutase (SOD)，ascorbate peroxidase (APX)，glutathione reductase (GR) 及 catalase (CAT)，抗氧化物則為 glutathione (GSH) 和 ascorbate (AsA)。其中 SOD 作為第一道防線，所參與的反應能將超氧自由基轉為過氧化氫 (Mittler, 2002)。就高等植物而言，SOD 因其輔基 (prosthetic group) 所含的金屬不同，可大分成三類，即 Cu/Zn SOD、MnSOD 和 FeSOD (Bannister *et al.*, 1987; Alscher *et al.*, 2002)。Cu/Zn SOD 存在於所有真核生物 (eukaryotes) 的葉綠體、細胞質或過氧化體 (peroxisome) (del Rio *et al.*, 2002)，為三種 SOD 之中於細胞內含量最豐富者。MnSOD 一般存在於粒腺體的基質 (matrix) 或過氧化體內 (del Rio *et al.*, 2003)，

在某些植物也發現葉綠體含有 MnSOD(Hayakawa T *et al.*, 1984)。相較於其他兩型 SOD，FeSOD 僅於少數植物中發現，且一般認為其應為葉綠體內的酵素(Bowler *et al.*, 1992)。

過氧化氫則可經由 CAT, APX, GR 和 ascorbate-glutathione 循環(Halliwell, 1987) (或 Halliwell -Asada 循環) 所清除。CAT 為一帶有 heme 結構的酵素，能將過氧化氫還原成水。且因其所在位置之故，主要是清除乙醛酸循環體 (glyoxysome) 和過氧化體 (peroxisome) 內所生成之過氧化氫。APX 所參與之抗氧化反應，則係利用 ascorbate 為反應受質，同樣將過氧化氫還原為水。比起 CAT (mM range)，APX 對過氧化氫的親和力 (μM range) 較高。一般認為二者為不同類別之過氧化氫清除酵素: APX 可能負責細微之調整過氧化氫在細胞中的含量以作為訊息分子，CAT 則在植物遭受逆境時負責清除過量累積之過氧化氫，特別 CAT 所存在之過氧化體在氧化逆境時會大量增生 (biogenesis) (Lopez-Huertas *et al.*, 2000)，當過氧化氫從細胞質進入過氧化體，便被 CAT 還原成水(Mittler, 2002)。

在 APX 的作用下，ascorbate (AsA) 轉變為 dehydroascorbate (DHA) 或 monodehydroascorbate (MDHA)。MDHA 可以不經酵素或是藉助 MDHA reductase (MDHAR) 的催化反應而再生成 AsA。DHA 再生為 AsA 的過程，亦可不經由酵素或是藉助 DHA reductase (DHAR) 參與催化反應，惟 DHAR 所參與的反應尚需以還原態之 glutathione (GSH) 為反應受質，而 GSH 於反應後則被氧化為氧化態 glutathione (GSSG)。GSSG 則經由 glutathione reductase (GR) 之催化反應，消耗 NADPH 而再生 GSH(Noctor & Foyer, 1998; Asada, 1999)。高等植物細胞內的 APX 與 GR 皆具有多種同功酵素，APX 於細胞內存在之位置包括細胞質、過氧化體、葉綠體內的基質 (stroma) 與類囊體膜 (thylakoid membrane)，另於粒腺體亦發現 APX 的存在(Gratão *et al.*, 2005)，GR 則主要位於粒線體與葉綠體內

(Mullineaux & Creissen, 1997)。上述抗氧化酵素及抗氧化物所參與的反應式如圖 1

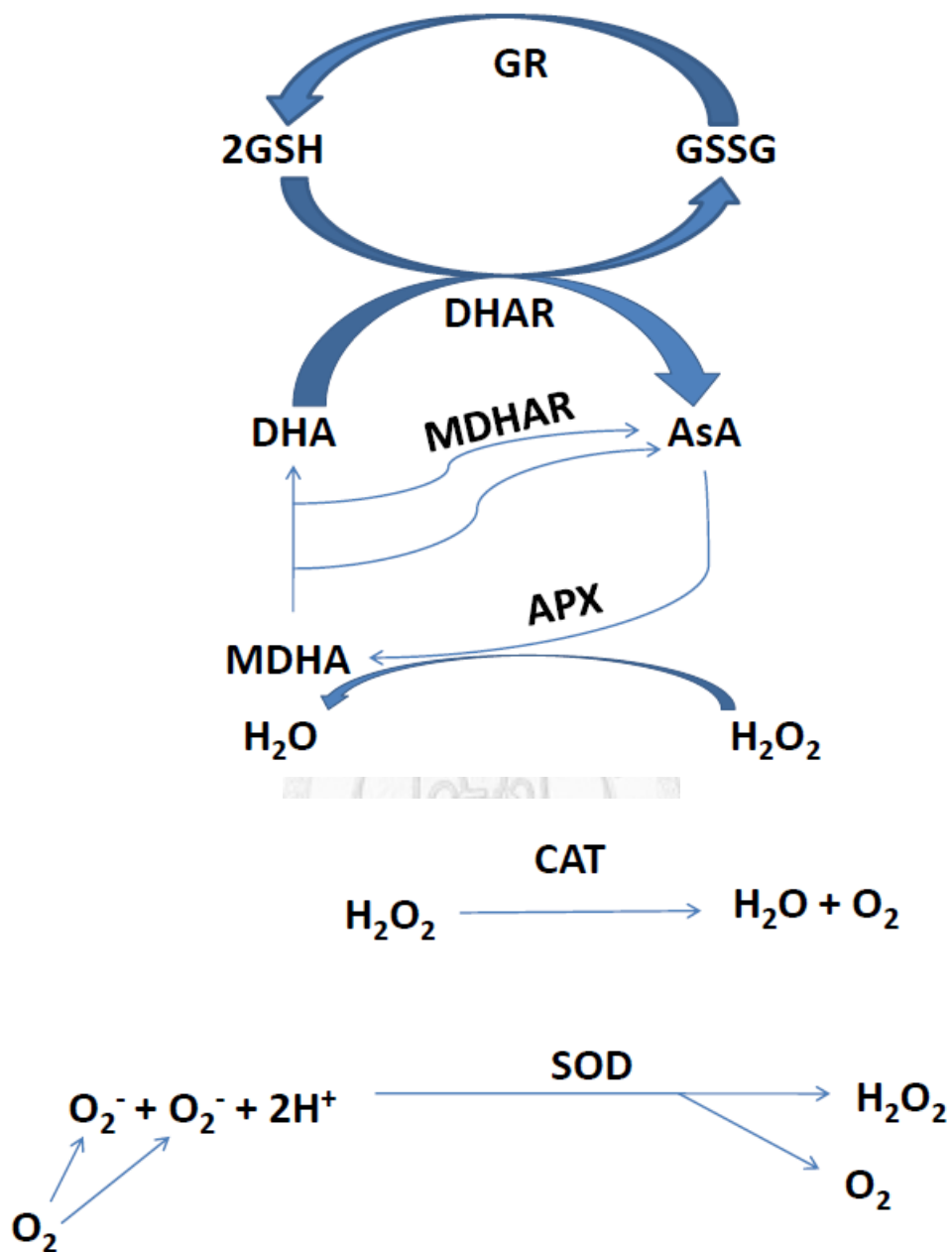


圖 1. 植物細胞中清除 ROS 的主要途徑

二、 鉀與植物生長

植物生長所需之元素可分為巨量元素和微量元素。鉀佔植物乾重的含量，可高達 10%，為植物生長的大量元素之一，且為植物細胞中含量最豐富的陽離子 (Leigh & Jones, 1984; Véry & Sentenac, 2003)。鉀在植物細胞是以鉀離子的型式存在，在植物細胞中的運輸主要是透過膜上之轉運蛋白或離子通道 (Szczerba *et al.*, 2009)。細胞之間、不同組織之間的運輸，甚至根部與地上部之韌皮部和木質部之間的運輸，鉀均有很高的流動性。鉀對於細胞及植物組織中之滲透壓 (osmotic potential)，鉀離子扮演很重要的角色。植物運動 (plant movement) 包括氣孔的張合與葉運動 (leaf movement) 等，均是由鉀累積所引起之膨壓所導致 (Maathuis & Sanders, 1996; Philippar *et al.*, 1999)。在植物細胞質及葉綠體均含有高濃度之鉀離子，鉀能夠平衡 (neutralize) 其中的陰離子，並維持細胞膜之 polarization (Clarkson & Hanson, 1980; Maathuis & Sanders, 1996)。

細胞中多種酵素的活化均仰賴鉀的存在 (Suelter, 1970)，鉀能夠改變這些酵素蛋白質的構型而活化這些酵素。鉀也能夠活化細胞膜上的 proton-pumping ATPase，不僅幫助根部細胞對鉀的吸收，也同時使鉀成為細胞生長 (cell extension) 和滲透調節 (osmoregulation) 中一重要離子。因為在多數情況下，細胞生長是由於鉀離子的累積，一面鉀離子進入細胞能藉由平衡流出之氫離子穩定細胞中的酸鹼值，以利酵素作用 (Pfluger & Cassier, 1977)，另一面也同時增加液泡的滲透壓 (Marschner, 2002)。

在高等植物的光合作用中，鉀也扮演相當重要的角色。葉綠體類囊膜 (thylakoid membrane) 上之 light-induced H^+ flux，以及膜上為合成 ATP 之 pH gradient 的建立，鉀離子即是主要的抗衡離子 (counterion)。對於二氧化碳之固定作用 (carbon fixation)，高濃度的鉀處裡，能夠大幅增加固碳作用的效率 (Pfluger & Cassier, 1977)。因乾旱導致光合作用的效率降低，若外加鉀處裡，則會減輕乾旱所造成的傷害

(Gupta *et al.*, 1989)。

三、 缺鉀對植物生長之影響

土壤鉀素下降乃至缺少,為普遍性之問題。民國 60 年代中期限以後,台灣各類瓜果菜類栽培技術改進,土壤則很快出現缺鉀,特別是南部高屏地區很突出地表現出普遍缺鉀現象。吳春才(2005)指出,土壤缺鉀其最根本的原因是違背了配方施肥的原則。忽視適度足量施肥,忽視有機肥的使用,氮、磷、鉀肥施用比例失調,或是耕作過度等等,均會導致土壤中鉀素下降。

當土壤中鉀素不足時,植物生長便受到抑制。由於鉀離子在植物中的流動性很高,所以缺鉀的現象是先表現在老葉。雙子葉植物在缺鉀時,老葉先呈現黃化,然後再有出現壞死的斑點。禾穀類植物在缺鉀時,壞死的現象則是在葉尖細胞先表現,再沿著葉緣向基部延伸(Marschner & Cakmak, 1989)。

鉀作為植物生長的必須元素,影響許多生理及生化的代謝途徑。當細胞中的鉀離子含量不足時,許多酵素活性受到影響,光合作用效率也會下降(Bednarz & Oosterhuis, 1999b)。在正常情況下,光合作用中約有 20%之電子傳遞鏈的電子會與氧分子結合而產生活化氧族(Robinson, 1988),若遭遇到生物及非生物逆境,二氧化碳之固定作用會大幅下降,NADP⁺無法形成,不能接受電子,過多的電子便與氧結合,形成大量的活化氧族。缺鉀所造成光合作用效率的下降,也伴隨著活化氧族的累積增加,若加上其他逆境的存在,如冷害(Larsen, 1976)、乾旱(Cakmak, 2005)或病蟲害(Marschner, 2002)等等,缺鉀均會使其對植物造成的傷害更為嚴重。

缺鉀時活化氧族的累積,也伴隨著抗氧化系統的提升,以保護植物免受氧化

傷害。過去的研究結果顯示，缺鉀會使菜豆中 APX、GR 等抗氧化酵素活性增加 (Cakmak, 1994)，以及水稻中 SOD 和 APX 的活性增加 (Weng *et al.*, 2007)。

四、 無機離子缺乏對 H₂O₂ 之影響

植物的生長環境常因地點、季節變換或氣候變遷而不同，其仰賴生存的土壤結構也常因外在環境而改變。土壤中之營養素缺乏一直是作物生產受限的主要原因之一。植物生長所需的無機離子缺乏時，生長受抑制，植物體本身亦會透過訊息傳遞的方式，改變其生理代謝途徑或外在型態，以適應養分不足時的逆境 (Schachtman & Shin, 2007)。

過去多項研究均發現 (Shin & Schachtman, 2004; Shin *et al.*, 2005; Gechev *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2009; Tanou *et al.*, 2009)，活化氧族在植物遭受逆境時能作為訊息分子，調控植物之生長、發育、向地生長 (gravitropism)、荷爾蒙反應 (hormone action) 及其他之生理反應 (Apel & Hirt, 2004)。例如植物遭受病菌攻擊時，植物細胞便透過活化細胞膜上之 NADPH oxidase，細胞壁之 peroxidase，apoplast 之 amine oxidase 等酵素 (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Grant & Loake, 2000)，產生活化氧族。其中所產生之 H₂O₂ 加上水楊酸 (salicylic acid) 和一氧化氮 (Klessig *et al.*, 2000)，便進入細胞，啟動細胞中的防禦反應 (Dangl *et al.*, 1996)。在乾旱逆境或鹽害逆境下，H₂O₂ 會調控下游抗氧化酵素的活性，幫助植株抵抗所遭受到的氧化逆境 (Lu *et al.*, 2009; Tanou *et al.*, 2009)。

植物因缺乏生長元素而產生之活化氧族，可作為訊息分子來調控植物中的下游反應 (Schachtman & Shin, 2007)。過去研究發現，阿拉伯芥在缺鉀時，其根部之 H₂O₂ 含量會增加，並且缺鉀所誘導之轉運蛋白或酵素基因表現，即是經由累積之過 H₂O₂ 所調控 (Shin & Schachtman, 2004)。阿拉伯芥在缺氮或缺磷時 H₂O₂ 含量的增加，亦

與下游多種酵素或轉運蛋白之基因表現有關(Shin *et al.*, 2005)。

由於多數無機離子進入細胞，是透過細胞膜上之轉運蛋白或離子通道，過去研究發現，植物在缺乏無機離子時，多種膜蛋白的含量會增加，好促進細胞吸收無機離子(Fernando *et al.*, 1990)，而這些膜蛋白之基因表現，即是透過H₂O₂的所調控(Shin & Schachtman, 2004; Shin *et al.*, 2005)。例如細胞膜上之nonselective cation channels (NSCC) 會幫助陽離子進出細胞膜，NSCC之活化需要活化氧族，包括H₂O₂及氫氧自由基的存在(Demidchik & Maathuis, 2007)。在乾旱逆境下脫落酸 (abscisic acid, ABA) 所誘導保衛細胞中的鈣離子通道的活化，也是透過H₂O₂所調控(Pei *et al.*, 2000)。

五、 無機離子缺乏對 ABA 之影響

ABA 為植物荷爾蒙，影響許多植物生長及分化的過程，如種子發芽與休眠、葉片的老化、開花時間或果實成熟等等(Zeevaart & Creelman, 1988)。此外，在植物遭受逆境時，ABA 作為訊息分子，能調整植物之代謝過程，好在不良的環境下生存(Leung & Giraudat, 1998)。過去研究發現，在乾旱、鹽害、冷害逆境下(Giraudat *et al.*, 1994; Ingram & Bartels, 1996; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996)，甚至植物直接受到機械損傷 (mechanical damage) (H Peña-Cortés *et al.*, 1995)時，多種基因之表現均受到 ABA 所調控，而改變下游之生理代謝反應。例如植物在乾旱逆境下，ABA 能調控氣孔的開合以降低蒸散作用所導致之水分散失(Horton, 1971)，增加植物細胞對水分子的滲透性 (permeability) (Glinka & Reinhold, 1971)，調控抗氧化酵素之活性以抵抗乾旱所導致之氧化逆境(Lu *et al.*, 2009)等。由於多數逆境多伴隨活化氧族的形成，過去研究發現，ABA 能調控細胞膜上之 NADPH oxidase 而產生活化氧族，進一步活化 Ca²⁺-permeable NSCCs，使鈣離子累積，而導致氣孔關閉(Demidchik & Maathuis, 2007)。

植物在缺乏生長所需之無機離子時，ABA 含量亦會累積。例如將菸草植株移到不含養分之蒸餾水培養，其無機離子的含量隨著培養天數增加而下降，ABA 含量也逐漸上升，但若是重新回到 Hoagland 水耕液栽培，則 ABA 含量又逐漸下降 (Mizrahi & Richmond, 1972)。蓖麻在缺磷時，ABA 在葉和根部的含量以及在韌皮部和木質部的運輸量均會增加 (Jaschke *et al.*, 1997)，在缺鉀時 ABA 在根部的含量亦會提升 (Peuke *et al.*, 2002)。

在缺乏無機離子時 ABA 含量之累積，可能與調控植物下游之生理代謝反應有關。過去研究發現，棉花在缺磷的狀況下，ABA 含量會累積，並且氣孔對 ABA 之反應的靈敏度會提高，即比起正常生長狀況下，較少量的 ABA 即會降低氣孔的導電度，以減少水分散失 (Radin, 1984)。硬粒小麥若生長在稀釋十分之一倍的水耕液中，ABA 含量在植株之地上部會累積，並且 ABA 含量之累積與植株在缺乏無機離子時之根部生長的促進有關 (Vysotskaya *et al.*, 2008)。

六、 鎘污染

重金屬一般泛指密度大於 5.0 g cm^{-3} 之金屬，在元素週期表屬於過渡元素。約九十種之天然元素中，其中五十三種即屬於重金屬。約有十七種重金屬為動植物生長所必須之元素，在生態系統中也扮演重要的角色 (DeLand, 1984)。如鋅、銅、鎳等為生物生長之微量元素，濃度過高才會對生物會產生毒害。而重金屬如砷、鉛、銀、汞等非生物生長之必須元素，少量即會造成生物之毒害 (Hasan *et al.*, 2009)。

鎘之密度約為 8.6 g cm^{-3} ，屬於非植物生長所需之重金屬元素。在工業上鎘主要被用作鎳鎘電池、染料、塗料色素及製造塑膠之穩定劑。台灣第一起鎘米事件，

主要是製造塑膠穩定劑之工廠排放廢水至灌溉渠道而污染農田所致。表土中鎘含量若超過 3 至 8 ppm，即可能會對作物產生毒害(Kabata-Pendias & Pendias, 1984)，若為其他生物或人類所食用，集中在肝臟或腎臟等器官(Asagba *et al.*, 2008)，經過生物放大作用 (biological magnification 或 bioaccumulation)，其在生物體之鎘濃度很可能遠大於工廠所排放出之廢水的鎘濃度。

高濃度的鎘會誘導動物細胞產生致癌因子、突變、甚至畸形(Das *et al.*, 1997)。人類歷史上最著名的鎘中毒事件即是 1950 年日本的富山縣神通川附近的痛痛病 (Itai-Itai disease, 「痛」的日音為 itai) 事件。由於當地有很多電鍍工廠、蓄電池製造廠，將含重金屬的廢水排到溝渠，污染四周稻田的灌溉水源，人們因為吃進被鎘污染的稻米而中毒，導致二十四人死亡。鎘中毒的病人會全身骨骼疼痛，病人的近端腎小管被破壞，最後會腎臟萎縮，發生尿毒症，病人因鈣質大量流失，容易骨折，病人因骨折疼痛，成天喊著「好痛！好痛！」所以稱為痛痛病(Nogawa & Kido, 1993)。

七、 鎘對植物的影響

重金屬在土壤中的累積會影響到大多數生物的生存。就植物而言，鎘易溶於水而被吸收，然後運送到地上部，因此土壤中只要有低濃度的鎘存在，即會對植物造成毒害(Seregin, 1998)。

鎘毒害最明顯的病徵就是植物生長受抑制。鎘會抑制種子發芽並影響幼苗發育(Stiborova *et al.*, 1987; Rascio *et al.*, 1993)，抑制側根形成，導致根部褐化、扭曲變形，還會影響到植株外觀，使葉片黃化凋萎或捲曲(Gunse *et al.*, 1992; Chen & Kao, 1995a; Wojcik & Tukendorf, 1999; Hsu & Kao, 2003c; Hsu & Kao, 2003a; Hsu & Kao,

2004; Hsu & Kao, 2005; Hsu & Kao, 2007c; Hsu & Kao, 2007b; Hsu & Kao, 2008)。植物根部生長受到抑制，是由於鎘會抑制有絲分裂（mitosis），降低細胞壁成分之合成，傷害高基氏體(Golgi apparatus)，並改變多醣類的代謝(Punz & Sieghardt, 1993)。植物所遭受的逆境，包括鎘毒害，會增加細胞壁中木質素（lignin）的含量，使細胞壁變硬，細胞生長便受到抑制(Degenhardt & Gimmler, 2000)。

鎘也會抑制植物行光合作用和蒸散作用，使氣孔關閉，細胞內含水量失去平衡，造成植物提早衰化（early aging）(Rascio *et al.*, 1993)。對於細胞中進行之代謝過程，鎘會抑制葉綠素及胡蘿蔔素的合成(Ferretti *et al.*, 1993)，改變細胞膜之結構而影響到膜蛋白的活性(Ros *et al.*, 1990)，並且鎘會損害葉綠體的結構(Rascio *et al.*, 1993)，抑制光合作用之二氧化碳固定的 Calvin Cycle，減少 NADPH 的使用，不能形成 NADP^+ 來接受電子，使大量的氧分子接受電子而形成活化氧族，造成氧化逆境(Pál *et al.*, 2006)。

八、 鎘對植物吸收離子之機制的影響

土壤中之重金屬會與植物生長所需的大量元素及微量元素交互作用，而影響植物對這些元素的吸收。鎘為二價陽離子之重金屬，非植物生長之必須元素，所以植物細胞並沒有特定的轉運蛋白來吸收鎘。過去研究發現，鎘會與多種陽離子競爭細胞膜上之轉運蛋白，而進入植物細胞中(Clemens, 2001)。以鋅離子為例，鎘處理會降低燕麥、萵苣、黃豆與菠菜之鋅含量(John, 1976; Smith *et al.*, 1985; McKenna *et al.*, 1993)，而外加鋅處理則可抑制硬小麥與麵包小麥對鎘之吸收(Hart *et al.*, 2002)，均說明鎘會與鋅競爭細胞膜上之轉運蛋白而進入植物細胞內。目前已知會與鎘競爭細胞膜上之陽離子轉運蛋白而進入細胞中者，包括鈣、鐵、鋅、錳等元素(Clemens, 2001)。

此外，鎘處理亦會明顯降低豌豆(Sandalio *et al.*, 2001)、阿拉伯芥(Smeets *et al.*, 2008; Besson-Bard *et al.*, 2009)及馬鈴薯(Gonçalves *et al.*, 2009)之銅、鋅、鐵、錳、鈣和鎂等離子含量，若是在鎘處理下，外加鈣、鋅等元素，則會降低莖葉對鎘之吸收，並顯著降低鎘毒害(John, 1976)。因此，鎘不僅是經由氧化逆境造成毒害，還可能藉由影響植物對其他離子之吸收而造成毒害(Hasan *et al.*, 2009)。

由於鎘污染主要發生於土壤或灌溉水，植物根部為主要吸收鎘之部位。過去研究發現植物所吸收之鎘主要累積在根部，並且鎘對其他離子吸收之影響，主要發生在植株之地上部，說明鎘會影響其他離子在植物中的運輸 (translocation)。

鉀為植物生長之大量元素之一，在植物細胞以鉀離子的形式存在。過去研究發現鎘亦會影響到植物對鉀離子之吸收。鎘處理會降低水稻(Rubio *et al.*, 1994)、白樺(Gussarsson *et al.*, 1996)、菜豆和蕃茄(Ouariti, 1997)、豌豆(L. E. Hernandez *et al.*, 1996; Sandalio *et al.*, 2001; Metwally *et al.*, 2005)、阿拉伯芥(Smeets *et al.*, 2008; Besson-Bard *et al.*, 2009)、馬鈴薯(Gonçalves *et al.*, 2009)之鉀離子含量，若是在鎘存在下同時處理鉀，則會大幅降低莖葉對鎘之吸收，並顯著降低鎘毒害(John, 1976)。

過去研究發現鎘的存在會影響到細胞內之鉀離子所誘導 membrane-bound ATPase 之活性並抑制鉀離子之吸收(Lindberg & Wingstrand, 1985)。因此，鉀含量在鎘處理下的變化，很可能受到這種酵素的影響(Sandalio *et al.*, 2001)。

九、 綜合逆境

作物在田間所遭受的逆境為多重而非單一逆境，並且最影響作物生長及產量

者，往往為這些逆境同時發生所造成的結果。Mittler(2006)提出多重逆境間具有交互作用的概念，指出植物對於兩種逆境交互作用下的反應為獨一的，而非直接從植物對單一逆境的反應來推斷。植物同時遭遇多種逆境，可能會同時活化不同之訊息傳遞路徑，而導致兩種逆境對作物的影響有協同作用或對抗作用。過去研究發現，荷蘭芹在高溫逆境下會失去對 UV-B 的反應(Walter, 1989)，而在其他植物，臭氧則會誘導 UV-B 或病蟲害之反應途徑(Sander mann, 2004)。

這些訊息傳遞路徑間的交互作用 (cross-talk) 可能會在細胞中不同之反應路徑上發生。可能是由於不同轉錄因子或 mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade 之間的交互作用(Cardinale *et al.*, 2002; Xiong & Yang, 2003)，不同的逆境賀爾蒙，如乙稀、茉莉酸或脫落酸之間的交互作用(Anderson *et al.*, 2004)，由鈣離子或活化氧族所調控之訊息傳遞之間的交互作用等等(Bowler & Fluhr, 2000; Mittler *et al.*, 2004)。過去研究發現，阿拉伯芥同時遭受高溫及滲透壓逆境 (osmotic stress) 時，乙稀即扮演相當重要的角色，並且一轉錄因子 MBF1c 之表現，能夠藉由活化乙稀所調控之訊息傳導路徑，而增加植物在此雙重逆境的抗性(Suzuki *et al.*, 2005)。因此未來對於多重逆境間之交互作用的研究，實有助於增加作物對田間逆境的抗性而增加產量。

近來本研究室亦發現，水稻幼苗在高溫下伴隨鎘處理，可能由於脫落酸含量增加，導致所受到之鎘毒害更嚴重(Hsu & Kao, 2008)。而水稻幼苗於缺氮(林雅琳, 2008)或缺硫(郭俊伶, 2008)伴隨鎘處理，可能由於抗氧化酵素活性及抗氧化物含量均下降，導致鎘所造成之氧化逆境更嚴重。但水稻幼苗若於缺鎂伴隨鎘處理(周庭邵, 2009)，可能由於抗氧化酵素活性及抗氧化物含量均上升，反而能減緩後續鎘處理所誘導之氧化傷害。

十、 研究室過去相關文獻探討

本研究室多年來致力於探討水稻幼苗與鎘逆境關係之研究：(一) 氯化鎘對水稻切離葉片乙稀形成之關連性(Hou & Kao, 1993; Chen & Kao, 1995c)。(二) 氯化鎘抑制水稻幼苗根生長之作用(Chen & Kao, 1995a; Chen & Kao, 1995b; Chen & Kao, 1995d)。(三) 氯化鎘對水稻毒害與銨離子累積之關連性(Chien & Kao, 2000; Chien *et al.*, 2002; Hsu & Kao, 2003a)。(四) 氯化鎘誘導水稻切離葉片氧化逆境(Chien *et al.*, 2001; Chien *et al.*, 2002)。(五) 脫落酸與水稻鎘耐受性之關連性(Hsu & Kao, 2003c; Hsu & Kao, 2005)。(六) 不同水稻品種對鎘耐受性之蛋白質與氨基酸含量變化之探討(Hsu & Kao, 2003b)。(七) 活化氧族與水稻耐受性之關連性(Kuo & Kao, 2004; Hsu & Kao, 2007c)。(八) 一氧化氮與鎘耐受性之關連性(Hsu & Kao, 2004)。(九) 高溫下與鎘雙重逆境誘導銨離子與脫落酸之關連性(Hsu *et al.*, 2006)。(十) 多元胺與鎘耐受性之關連性(Hsu & Kao, 2007a)。(十一) 熱休克處理與鎘耐受性之關連性研究(Hsu & Kao, 2007b)。

近年來，本研究室也開始著手於水稻幼苗於雙重逆境下的研究：(一) 高溫下水稻幼苗之鎘逆境(Hsu & Kao, 2008)。(二) 缺氮與水稻幼苗鎘逆境之探討(林雅琳, 2008)。(三) 缺硫與水稻幼苗鎘逆境之研究(郭俊伶, 2008)。(四) 缺鎂與水稻幼苗鎘逆境：鎂或熱休克之效應(周庭邵, 2009)。

十一、 論文研究方向

本論文共分兩部分，第一部份是延續過去多重逆境之基礎概念，欲探討缺鉀與水稻鎘逆境關係之研究。第二部分則著重於鎘毒害對水稻幼苗吸收鉀離子之影響。

材料與方法

本論文共分兩大部份，第一部份探討水稻幼苗於缺鉀狀態下，對鎘逆境生理的影響，第二部份探討鎘毒害對水稻幼苗吸收鉀的影響。第一部份使用材料為台中在來一號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1)，第二部份的使用材料為台中在來一號和台農六十七號 (Tainung 67, TNG67)，皆以水耕方式栽培。

一、 材料種植與處理

選取飽滿之穀粒，以 3% 次氯酸鈉溶液浸泡消毒 15 分鐘後，再以自來水流洗穀粒至無餘氯之氣味。將穀粒均勻播於鋪有已濕潤的吸水紙之培養皿（直徑 20 公分）中，在 37°C、黑暗之催芽箱中催芽 24 到 36 小時。選露白之穀粒，撒播於盛有半量木村氏水耕液(戶刈義次, 1963)之燒杯內的三腳網架上，燒杯外層以鋁箔紙包覆避光，分別以正常或缺鉀水耕液栽培，水耕液之配製於下文中敘述。種植於日溫 30°C/夜溫 25°C、相對濕度介於 75% 至 90%、自然光照之人工氣候室中。每隔 3 天更換水耕液 1 次，直至水稻幼苗第三片葉片（即第二完全葉葉片）完全展開（葉環出現）後，切取處理第二葉片、地上部或根部進行各項化學與酵素分析，或選取整齊一致之植株給予不同處理，經適當時間後再選取材料作各項分析。其中鎘處理是以 5 μM 之 CdCl_2 處理 6 天，鎘毒害的指標是以第二片葉黃化程度、葉綠素含量下降或 malondialdehyde (MDA) 含量之上升表示。每 10 片或 20 片第二葉片、10 株地上部或 10 株根部為一重複，每一處理重複四次。

二、 水耕液之配製

(一) 正常水耕液之配方

每 1 L 的正常水耕液 (表格 1), 內含 stock A 液 1 mL、stock B 液 1 mL 及 stock C 液 1 mL, 皆以一次蒸餾水配製, 並將 pH 值調整至 4.7~4.8。

表格 1. 正常水耕液之配方

A:	in 1 L	→ 即為 stock A。
(500x)	(NH ₄) ₂ SO ₄	24.1 g
	KNO ₃	9.25 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	67.5 g
	KH ₂ PO ₄	12.4 g
B:	in 1 L	→ 即為 stock B。
(500x)	Fe-citrate	7.5 g
	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	43.1 g
	1N HCl	500 mL
C:	in 1 L	→ 再稀釋 10 倍即為 stock C。
(10,000x)	H ₃ BO ₃	1.55 g
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.34 g
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.58 g
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.13 g
	H ₂ MoO ₄	0.08 g

(二) 缺鉀水耕液之配方

每 1 L 的缺鉀水耕液 (表格 2), 內含 stock A 液 1 mL、stock B 液 1 mL 及 stock C 液 1 mL, 皆以一次蒸餾水配製, 並將 pH 值調整至 4.7~4.8。

表格 2. 缺鉀水耕液之配方

A:	in 1 L	→ 即為 stock A。
(500x)	(NH ₄) ₂ SO ₄	24.1 g
	NaNO ₃	7.9 g

	MgSO ₄ · 7H ₂ O	67.5 g
	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	14.3 g
B :	in 1 L	→ 即為 stock B 。
(500x)	Fe-citrate	7.5 g
	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	43.1 g
	1N HCl	500 mL
C :	in 1 L	→ 再稀釋 10 倍即為 stock C 。
(10,000x)	H ₃ BO ₃	1.55 g
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.34 g
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.58 g
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.13 g
	H ₂ MoO ₄	0.08 g

三、 化學成份與基因表現分析

(一) 鉀含量測定

鉀含量的測定是根據 Jordan-Meille 和 Pellerin (2008) 之方法修改而得。取 10 片第二片葉片、10 株地上部或根部，置於 65°C 烘箱烘乾兩天，並測乾重。再將材料剪碎，於 550°C 灰化爐中灰化 4 天（樣品需呈灰白色）。冷卻至室溫後，再分別加入 100 μL 濃 NHO₃ 及 100 μL 35% H₂O₂。於 70°C 持續加熱至 NHO₃ 及 H₂O₂ 蒸乾。加入 2 mL 的二次蒸餾水，以原子吸收光譜儀（Z-2000 Series Atomic Absorption Spectrophotometer, Shimadzu AA680, Japan）測定鉀含量。曲線範圍為 0~2 ppm (μg mL⁻¹) K (以 1000 ppm 之 K 標準液配置)。鉀含量之計算為以 Reading 值 (ppm, μg mL⁻¹) × 稀釋倍數 (2 倍) ÷ 樣品乾重 (g)。鉀含量之表示法為每克乾重所含鉀之 milligram 數 (mg g⁻¹ DW)。

(二) 鎘含量測定

鎘含量的測定是採用 Fuhrer(1982)之方法修改而得。取 10 株地上部或根部，置於 65°C 烘箱烘乾兩天，並測乾重。再將材料剪碎，於 550°C 灰化爐中灰化 4 天（樣品需呈灰白色）。冷卻至室溫後，再分別加入 100 μL 濃 NHO_3 及 100 μL 35% H_2O_2 。於 70°C 持續加熱至 NHO_3 及 H_2O_2 蒸乾。加入 2 mL 的二次蒸餾水，以原子吸收光譜儀 (Z-2000 Series Atomic Absorption Spectrophotometer, Shimadzu AA680, Japan) 測定鎘含量。曲線範圍為 0~2 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Cd (以 1000 ppm 之 CdCl_2 標準液配置)。鎘含量之計算為以 reading 值 (ppm, $\mu\text{g mL}^{-1}$) \times 稀釋倍數 (2 倍) \div 樣品乾重 (g)。鎘含量之表示法為每克乾重所含鎘之 μgram 數 ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)。

(三) 葉綠素含量測定

葉綠素含量是根據 Wintermans and Mots (1965) 修改而得。取 10 片第二片葉，秤取鮮重後，以 2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 將材料研磨成均質。取 40 μL 萃取液於 1.5 mL 離心管，並加入 960 μL 、100% 的乙醇，混合均勻，於 4°C 黑暗下靜置 30 分鐘，再於 4°C 以 1000 g (離心機均為 Sigma, 2K-15 型) 離心 15 分鐘，取上清液以分光光度計 (均為 Hitachi U-2800 spectrophotometer) 測定 665 nm (A_{665}) 與 649 nm (A_{649}) 波長之吸光值。空白試驗以 95% 之乙醇取代上清液。葉綠素濃度為 [$\mu\text{g Chl (40 } \mu\text{L)}^{-1}$] 依公式 $(6.1 \times A_{665}) + (20.04 \times A_{649})$ 計算而來。每克鮮種之葉綠素含量 (mg g^{-1} FW) 為葉綠素濃度 \times 50 (稀釋倍數) \div 1000 \div 樣品鮮種 (g)。

(四) 蛋白質含量測定

蛋白質含量是根據 Bradford(1976)之方法修改而得。取 10 片第二片葉，秤取鮮重後，以 2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 將材料研磨成均質。在 4

℃下以 17600 g 離心 20 分鐘。離心後吸取 20 μL 之上清液加入 5 mL 之 dye solution，震盪使其均勻後，靜置約 10 分鐘，接著以分光光度計測定 595 nm 波長之吸光值 (A_{595})。

以牛血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA) (5 μg 、10 μg 、20 μg 、40 μg 、60 μg 、80 μg 、100 μg)，依同樣步驟作標準曲線，求得消光係數為 0.01 $\mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。可溶性蛋白質含量是以每克鮮重 (fresh weight, FW) 含可溶性蛋白質之毫克數表示，即每克鮮重之蛋白質含量 ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$) 為 $A_{595} \div 0.01$ (消光係數) $\div 1000 \div$ 樣品鮮重 (g)。

Dye solution 之配置方法為秤取 100 mg comassie brilliant blue G-250，加入 50 mL 乙醇 (95%，v/v) 且加入少許二次蒸餾水攪拌至完全溶解後，再加入 100 mL phosphoric acid (85%，v/v)，然後以二次蒸餾水定量至 1 L。將溶液搖混均勻後，以 Whatman NO.1 濾紙過濾，所得濾液即為 Dye solution。置於褐色瓶中，儲存於 4℃ 冰箱備用。

(五) 脂質過氧化作用測定

MDA 是由於細胞膜上的脂質受到活化氧族的傷害而產生的，其含量的增加表示細胞膜及其功能的改變，所以在本論文之試驗中，以 MDA 含量增加程度作為脂質過氧化程度的指標。MDA 含量測定，是根據 Heath 與 Packer(1968)之方法修改而得。取 20 片第二片葉，秤取鮮重後，以 4 mL trichloroacetic acid (TCA) (5%，w/v) 將材料研磨成均質。在室溫下以 10000 g 離心 5 分鐘，吸取 1 mL 之上清液注入試管，再加入 4 mL thiobarbituric acid (TBA) (0.5%，w/v，溶於 TCA[20%，w/v] 中)。混合均勻後置於 95℃ 熱水浴 30 分鐘，然後迅速將試管插入冰中，終止反應。

約 5 分鐘後取出試管震盪，去除氣泡。在室溫下以 2000 g 離心 10 分鐘後，取上清液以分光光度計測定 532 nm (A_{532})、600 nm (A_{600}) 波長之吸光值。空白試驗是以 1 mL 之 TCA (5%, w/v) 代替萃取液。MDA 含量之計算為 $(A_{532} - A_{600}) \div 155$ (消光係數, $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) $\times 5$ (體積, mL) $\times 4$ (稀釋倍數) $\times 1000$ ($\text{nmol}/\mu\text{mol}$) \div 樣品鮮重 (g)。MDA 含量之表示法為每克鮮重所含 MDA 之 nmol 數 (nmol g^{-1} FW)。

(六) 過氧化氫含量之化學分析

過氧化氫含量測定，是根據 Jana 與 Choudhuri(1981)之方法修改而得。取 10 片第二片葉或 10 株根部，秤取鮮重後，以 3 mL (若是根部以 11 mL 研磨) sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8, 內含 1 mM hydroxylamine) 將材料研磨成均質。萃取液於 4°C 下以 6000 g 離心 25 分鐘。吸取 2 mL 之上清液加入 1 mL titanium chloride (TiCl_4 [0.1%, v/v]溶於 H_2SO_4 [20%, v/v])，震盪混合均勻，在室溫下以 1000 g 離心 15 分鐘。取上清液以分光光度計測定 410 nm 波長之吸光值 (A_{410})。空白試驗是以 2 mL 之 sodium phosphate buffer 代替萃取液。過氧化氫含量之計算為以 410 nm 之吸光值 $\div 0.28$ (消光係數, $\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) $\times 1.5$ (稀釋倍數, 根部 $\times 4$) \div 樣品鮮重 (g)。過氧化氫含量之表示法為每克鮮重所含過氧化氫之 μmol 數 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)。

(七) ABA 含量測定

ABA 以 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 與 Rab16A 基因表現方法來測定。

以 ELISA 分析 ABA 含量是根據 Hurng 等人(1994)之方法修改而來。取水稻第

二片葉片十片，以 6 mL 甲醇[80% (v/v)，含 2%冰醋酸]冰浴研磨成均質，將萃取液靜置於黑暗 4°C 下至少 24 小時（可存放一週）。於室溫下以 2000 g 離心 10 分鐘後，取 1 mL 之上清液真空乾燥（SpeedVac Concentrator，Savant - SC110）。完全乾燥後，加入 0.5 mL 甲醇（100%）回溶，再加入 0.5 mL $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ （0.2 M, pH 6.8），震盪使其完全溶解。於 4°C 靜置 10 分鐘，將樣本注入 PVP column（以 waters 之 Vacuum manifold 抽氣），再以 6 mL 蒸餾水流洗管柱，收集濾液後加入 100 μL 冰醋酸，共得濾液 7.1 mL。

將濾液注入 C_{18} column（Sep-Pak® Vac C_{18} cartridge，Waters），同樣以 waters 之 Vacuum manifold 抽氣（流量不超過 1.5 mL min^{-1} ），加入 4 mL 清洗液[甲醇（20%，v/v）、冰醋酸（2%，v/v）]流洗管柱後，濾液丟棄。樣品於注入 4 mL 萃取液[甲醇（55%，v/v）、冰醋酸（2%，v/v）]後洗出，收集濾液進行真空乾燥（可暫存於 4°C 黑暗下，一週內分析完畢）。

以 200 μL TBS buffer 回溶已乾燥之樣品。取 100 μL ABA 標準液或樣品加入 anti-ABA coated plate 之樣本槽中（Phytodetek® ABA Kit，Agdia Biofords），於每一樣本槽加入 100 μL tracer solution，以膠紙密封後，於 4°C 黑暗下靜置 3 小時。倒出樣本槽中之液體，以 200 μL wash solution 清洗樣本槽三次，每次 10 分鐘。每一樣本槽加入 200 μL reaction buffer 後，立刻放入 ELISA microplate reader（ELX808 Ultra Microplate Readers，BioTek Instruments）中，每五分鐘讀取波長 405 nm 之吸光值（ A_{405} ），待標準 ABA 最低濃度之 A_{405} 達 1.2 以上停止。各種試劑的配置方法見表格 3。

標準曲線係以不同濃度之 ABA 溶液，以上述方法讀取波長 405 nm（ A_{405} ）之吸光值後換算結合百分率（Binding %），由 ABA 濃度與 Binding % 建立標準曲線。

樣品亦可由波長 405 nm (A_{405}) 之吸光值後換算成 Binding %，再由標準曲線求得 ABA 含量。Binding % 依下列公式估算而得： $\text{Binding \%} = [(\text{標準 ABA 溶液或樣品之 } A_{405} - 1000 \text{ pmol mL}^{-1} \text{ ABA 之 } A_{405}) \div (\text{不含 ABA 之 } A_{405} - 1000 \text{ pmol mL}^{-1} \text{ ABA 之 } A_{405})] \times 100\%$ binding。每克鮮重之 ABA 含量 ($\text{pmol g}^{-1} \text{ FW}$) 為 Binding % 換算之 ABA 含量 (pmol) \div 樣品鮮重 (g)。

表格 3. ABA 含量測定之 ELISA 反應試劑配置方法

試劑名稱	配置方法
TBS buffer	1000 mL 的溶液中含有 3.03 g 的 trizma base，5.84 g 的 NaCl，0.2 g 的 $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ，0.02 g 的 NaN_3 ，pH 7.5。
Tracer solution	使用 Phytodetek® ABA Kit 所附，1 瓶 tracer 先加 1 mL 蒸餾水，5 分鐘後每瓶 tracer 再加 4 mL tracer diluent (kit 所附) 備用，此 solution 應鮮配。
Wash solution	使用 Phytodetek® ABA Kit 所附。其配方為 1000 mL 溶液中含有 8 g 的 NaCl，1.15 g 的 Sodium phosphate (dibasic, anhydrous)，0.2 g 的 Potassium phosphate (monobasic, anhydrous)，0.2 g 的 KCl，0.5 g 的 Tween-20，0.2 g 的 NaN_3 ，pH 7.4。
Reaction buffer	使用 Phytodetek® ABA Kit 所附：一顆 PNP (p-nitrophenyl phosphate disodium salt) substrate tablet (5 mg PNP/tablet) 溶於 5 mL substrate diluent。其配方為 1000 mL 溶液中含有 0.1 g 的 MgCl_2 ，97 g 的 diethanolamine，0.2 g 的 NaN_3 ，pH 9.8。

Rab16A 基因表現之檢測

水稻葉片 RNA 之抽取與分析的步驟為：經正常與缺鉀水耕液培養之三葉齡水稻幼苗，取 40 片第二片葉片，加入 1.4 mL TRIzol® Reagent (Cat. No. 15596-018, Invitrogen) 萃取 5 分鐘。於 4°C 以 13,220g 離心 10 分鐘，取上清液加入 0.2 mL chloroform，混合均勻後靜置 5 分鐘。接著以 4°C，13,220g 離心 15 分鐘，取出上清液並加入 0.5 mL isopropanol，混合均勻，於 -20°C 靜置 1 小時。再以 4°C，13,220g

離心 15 分鐘，去除上清液，分別以 75%、100%之酒精清洗沈澱物，將樣品風乾後取 60 μ L 經 diethylpyrocarbonate (DEPC) 處理過之蒸餾水回溶 RNA，樣本最後保存於-80 $^{\circ}$ C。RNA 樣品經 DNase I 處理移除 genomic DNA 後，取 5 μ g 經 DNase I 處理過之 RNA 進行反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR, SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen)。以水稻 *OsUbiquitin* 基因作為控制組。所設計各個基因引子序列與 PCR 反應條件於表格 4。

表格 4. RT-PCR 基因引子序列

Gene	TIGR Locus Name	Primer	Sequence (5'-3')	Products (bp)
<i>OsUbiquitin</i>	LOC_Os03g13170.1	Ubiquitin-5'	CGCAAGTACAACCAGGACAA	101
		Ubiquitin-3'	TGGTTGCTGTGACCACACTT	
<i>OsRab16A</i>	LOC_Os11g26790.1	Rab16A-5'	CGACACACCACCACACCATG	294
		Rab16A-3'	TGTGTACATATGCACGATGA	

(八) AsA 與 DHA 含量測定

AsA 含量是根據 Law(1983)修改而得。取 10 片第二片葉，秤取鮮重後，以 1 mL trichloroacetic acid [TCA (5%, w/v)] 冰浴研磨成均質。將萃取液於 15000 g 離心 20 分鐘，取上清液，分別進行 ASC+DHA 分析與 ASC 分析分析。

1. AsA+DHA 含量分析

取 200 μ L 上清液，加入 200 μ L sodium phosphate buffer (150 mM, pH 7.4)，

室溫下混合均勻，加入 100 μL DTT (dithiothreitol, 10 mM) ，室溫下靜置 15 分鐘，再加入 100 μL N-ethylmaleimide [0.5 % (w/v)]。加入 400 μL TCA [10 % (w/v)]及 400 μL phosphoric acid 44 % ，振盪均勻，再加入 400 μL 2, 2'-bipyridyl [4 % (w/v, 溶於 70 % 乙醇) ，振盪均勻，加入 200 μL FeCl_3 [3 % (w/v)]，於 37 $^{\circ}\text{C}$ ，水浴搖晃 1 小時，最後再以 10000 g 離心 5 分鐘，以分光光度計測定 525 nm 波長之吸光值(A_{525})。空白試驗是以 200 μL 之 TCA [(5%, w/v)]代替萃取液。AsA+DHA 含量之計算為以 525 nm 之吸光值 \div 8.092 (消光係數, $\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) \times 5 (稀釋倍數) \div 樣品鮮重(g)。ASC+DHA 含量之表示法為每克鮮重所含 AsA+DHA 之 μmol 數($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)。

2. AsA 含量分析

取 200 μL 上清液，加入 200 μL sodium phosphate buffer (150 mM, pH 7.4)，室溫下混合均勻，加入 100 μL 二次蒸餾水，室溫下靜置 15 分鐘，再加入 100 μL 二次蒸餾水。後續步驟均與 AsA+DHA 含量分析相同。ASC 含量之計算為以 525 nm 之吸光值 \div 8.092 (消光係數, $\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) \times 5 (稀釋倍數) \div 樣品鮮重 (g)。AsA 含量之表示法為每克鮮重所含 AsA 之 μmol 數 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)。

3. DHA 含量分析

$$\text{DHA 含量 } (\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}) = (\text{AsA+DHA 含量}) - \text{AsA 含量}$$

(九) GSH 與 GSSG 含量測定

GSH 含量是根據 Smith (1985) 修改而得。取 10 片第二片葉，秤取鮮重後，以

1 mL sulfosalicylic acid [SSA (5%, w/v)] 研磨成均質。將萃取液於 15,000 g 離心 10 分鐘，取上清液，分別進行 GSH+GSSG 分析與 GSSG 分析。

1. GSH+GSSG 含量分析

取 25 μL 上清液注入 8 \times 12 個樣本槽之 microplate，以 8 爪手動微量分注吸管 (finnpipette, 30-300 μL , Thermo) 加入 175 μL sodium phosphate [143 mM, pH 7.5, 含 6.3 mM EDTA 及 0.3 mM NADPH]，再以 8 爪手動微量分注吸管 (finnpipette, 5-50 μL , Labsystems) 加入 20 μL 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)[DTNB, 6 mM, 溶於 0.1 M, pH 7.2, 含 0.1 mM EDTA 的 sodium phosphate buffer 中]，再加入 20 μL GR (25 unit mL^{-1} , 原液為 168 units / mg protein, 以 143 mM, pH 7.5 之 sodium phosphate buffer 稀釋)，立即將 microplate 放入 ELISA microplate reader (ELX808 Ultra Microplate Readers, BioTek Instruments) 測定 600 秒內波長在 412 nm 之吸光值 (A_{412}) 的變化。標準曲線以 10 μL GSH 加蒸餾水配製，再以標準曲線換算出 GSH+GSSG 之實測含量。GSH+GSSG 含量之計算為實測含量 \times 40 (稀釋倍數) \div 1000 \div 樣品鮮重 (g)。GSH+GSSG 含量之表示法為每克鮮重所含 GSH+GSSG 之 nmol 數 (nmol g^{-1} FW)。

2. GSSG 含量分析

取 200 μL 上清液，加入 4 μL 2-vinylpyridine，震盪均勻，於室溫黑暗下反應一小時。再加入 6 μL triethanolamine (Tea, 30 mM)，震盪均勻，於室溫黑暗下反應 15 分鐘，再以 15,000 g 離心 5 分鐘。取 25 μL 上清液注入 8 \times 12 個樣本槽之 microplate，後續步驟均與 GSH+GSSG 含量測定相同。標準曲線以 10 μL GSSG 加蒸餾水配製，再以標準曲線換算出 GSSG 之實測含量。GSSG 含量之計算為實測含量 \times 40 (稀

釋倍數) ÷ 1000 ÷ 樣品鮮重 (g)。GSSG 含量之表示法為每克鮮重所含 GSSG 之 nmol 數 (nmol g⁻¹ FW)。

3. GSH 含量分析

$$\text{GSH 含量 (nmol g}^{-1}\text{ FW)} = (\text{GSH+GSSG 含量}) - \text{GSSG 含量}$$

四、 酵素活性分析

(一) SOD 活性分析

SOD 之抽取與活性分析是根據 Paoletti 等人(1986)之方法修改而得。取 10 片第二葉片，以 3 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4)冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C，15,000 g 離心 30 分鐘，所得之上清液即為酵素萃取液。取 0.2 mL 酵素萃取液，依序加入 1.6 mL triethanolamine- diethanolamine (Tea-Dea buffer, 100 mM, pH 7.4)，0.08 mL NADH (7.5 Mm, 需新鮮配製)，0.05 mL EDTA/MnCl₂ (100 mM/50 mM, pH 7.0)，以及 1 mL 2-mercaptoethanol (10 mM, 啟動反應)，於比色管內混合均勻後，立即以分光光度計測定 10 分鐘內波長在 340 nm (ΔA_{340}) 之吸光值的變化。以空白比色管做歸零的動作，不含酵素萃取液之 ΔA_{340} 係以 0.2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) 代替上清液。每一單位酵素活性 (Unit) 為每分鐘 SOD 抑制 50% NADH 之氧化速率。SOD 活性 (units g⁻¹ FW) 為 [(不含酵素萃取液所得到之 ΔA_{340}) - (含酵素萃取液所得到之 ΔA_{340})] ÷ 1/2 (不含酵素萃取液所得到之 ΔA_{340}) × 15 (稀釋倍數) ÷ 10 (分鐘) ÷ FW (g)。

(二) APX 活性分析

APX 之抽取與活性分析是根據 Nakano 與 Asada 之方法(1981)修改而得。取 10 片第二葉片，以 4 mL Sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8)冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C，12,000 g 離心 20 分鐘，所得之上清液即為酵素萃取液。取 0.1 mL 酵素萃取液，依序加入 1 mL potassium phosphate buffer (150 mM，pH 7.0)，1 mL AsA (1.5 mM，需新鮮配製)，0.4 mL EDTA (0.75 mM)，以及 0.5 mL H₂O₂ (6 mM，需新鮮配製)，於比色管內混合均勻後，立即以分光光度計測定 1 分鐘內波長在 290 nm (ΔA_{290}) 之吸光值的變化量。以蒸餾水或酒精以蒸餾水或酒精作為空白組。每一單位酵素活性 (Unit) 為每分鐘消耗 1 μmol AsA 表示。APX 活性 ($\text{units g}^{-1} \text{FW}$) 為 $\Delta A_{290} \div 2.8$ (消光係數， $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\times 3$ (反應體積) $\times 40$ (稀釋倍數) $\div 1$ (分鐘) $\div \text{FW (g)}$ 。

(三) GR 活性分析

GR 之抽取與活性分析是根據 Foster 與 Hess (1980)之方法修改而得。取 10 片第二葉片，以 4 mL Sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8)冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C，12,000 g 離心 20 分鐘，所得之上清液即為酵素萃取液。取 0.2 mL 酵素萃取液，依序加入 1 mL Tris-HCl buffer (150 mM, pH 7.5)，0.3 mL MgCl₂ (30 mM)，0.5 mL GSSG (3 mM，新鮮配製)，以及 1 mL NADPH (0.45 mM，需新鮮配製)，於比色管內混合均勻後，立即以分光光度計測定 1 分鐘內波長在 340 nm (ΔA_{340}) 之吸光值的變化量。以蒸餾水或酒精以蒸餾水或酒精作為空白組。每一單位酵素活性 (Unit) 以每分鐘 ΔA_{340} 的變化量來表示。GR 活性 ($\text{units g}^{-1} \text{FW}$) 為 $\Delta A_{340} \times 20$ (稀釋倍數) $\div 1$ (分鐘) $\div \text{FW (g)}$ 。

(四) CAT 活性分析

CAT 之抽取與活性分析是根據 Kato 與 Shimizu(1987)之方法修改而得。取 10 片

第二葉片，以 4 mL Sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8)冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C，12,000 g 離心 20 分鐘，所得之上清液即為酵素萃取液。取 0.2 mL 酵素萃取液，依序加入 2.7 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0)以及 0.1 mL H₂O₂ (1 M，需新鮮配製)，於比色管內混合均勻後，立即以分光光度計測定 1 分鐘內波長在 240 nm (ΔA_{240}) 之吸光值的變化量。以蒸餾水或酒精以蒸餾水或酒精作為空白組。每一單位酵素活性 (Unit) 為每分鐘消耗 1 nmol H₂O₂ 表示。CAT 活性 (units g⁻¹ FW) 為 $\Delta A_{240} \div 40$ (消光係數, mM⁻¹cm⁻¹) $\times 3$ (反應體積) $\times 20$ (稀釋倍數) $\div 1$ (分鐘) \div FW (g)。

五、 供試藥劑配置

供試藥劑原液，其中 CdCl₂、tungstate 及 imidazole (IMD) 均以二次蒸餾水配置所需濃度，唯 ABA 先以數滴 1 N NaOH 溶解後，以二次蒸餾水定量，再以 HCl 調整溶液 pH 值至 5.5。

六、 數據統計分析

本論文每一試驗處理均有四個重複，結果為其平均值加上標準差 (standard error) 表示。統計分析方法是採用 statistic analysis system (SAS) 軟體 9.1 版進行 Student's *t*-test 或 least significant difference (LSD) 分析 (P < 0.05)，比較各處理間平均值之差異。

結果

一、鎘對缺鉀水稻幼苗之影響

(一) 缺鉀處理對水稻幼苗之外表型態與鉀含量之影響

生長於缺鉀水耕液之水稻幼苗，其植株較對照幼苗矮小，且第二片葉片之葉尖有黃化現象（圖 2）。分析第二片葉片、地上部與根部之鉀含量，缺鉀處理均導致水稻幼苗之鉀含量明顯下降（圖 3A, B, C）。

(二) 缺鉀處理對水稻幼苗 H_2O_2 含量及抗氧化系統之影響

欲瞭解水稻幼苗於缺鉀處理下是否會形成活化氧族並影響到抗氧化系統，測定第二片葉片和根部 H_2O_2 含量，以及抗氧化系統之變化。缺鉀會造成水稻幼苗第二片葉片及根部之 H_2O_2 含量增加（圖 4A, B）。缺鉀亦會明顯增加抗氧化酵素 SOD（圖 5A），APX（圖 5B），GR（圖 5C）與 CAT（圖 5D）之活性，但不影響到抗氧化物 AsA 含量（圖 5E）及 DHA/AsA 之比值（圖 5F）與 GSH 含量（圖 5G）及 GSSG/GSH 之比值（圖 5H）。

(三) 外加 IMD 對缺鉀水稻幼苗葉片 H_2O_2 含量及抗氧化酵素活性之影響

欲瞭解缺鉀處理所導致水稻幼苗 H_2O_2 之含量增加是否經由活化細胞膜上之 NADPH oxidase，並且抗氧化酵素活之提升是否經由 H_2O_2 所調控，待缺鉀處理之水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開，額外處理 3 小時 NADPH oxidase 活性之抑制劑，IMD，分析 H_2O_2 含量及抗氧化酵素活性。結果發現，3 小時之 IMD 處理能

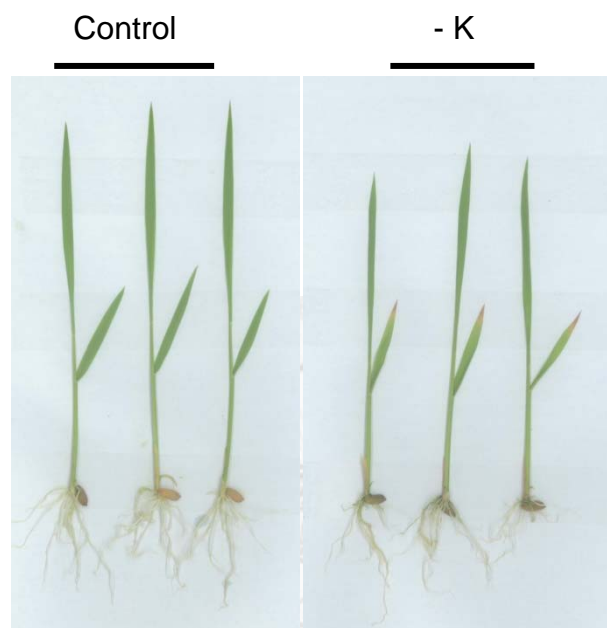


圖 2. 水稻種子發芽後分別生長於缺鉀 (- K) 或不缺鉀(對照, Control)木村氏水耕液至第三葉完全展開後之外表型態。

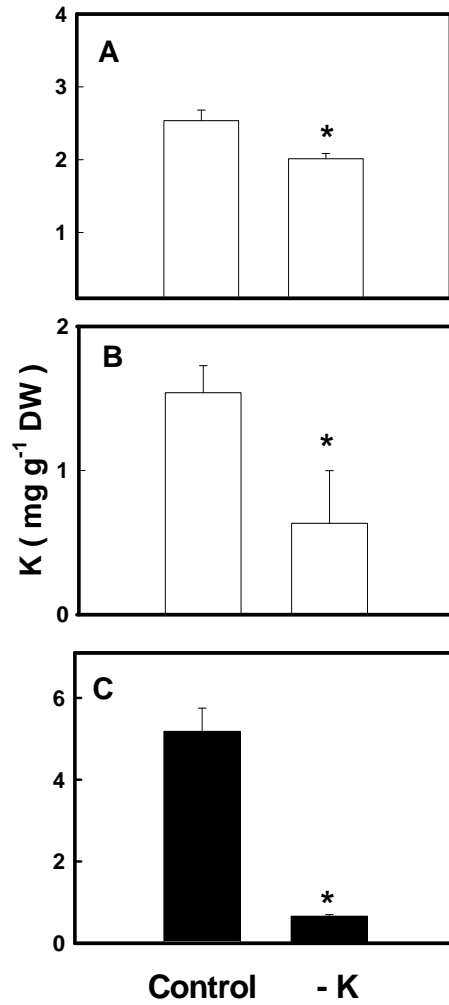


圖 3. 缺鉀 (-K) 對水稻幼苗第二片葉片 (A) 地上部 (B)、及地下部 (C) 鉀含量之影響。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 Student's t-test 統計分析方法進行顯著性測驗。*表示有顯著差異($P < 0.05$)。

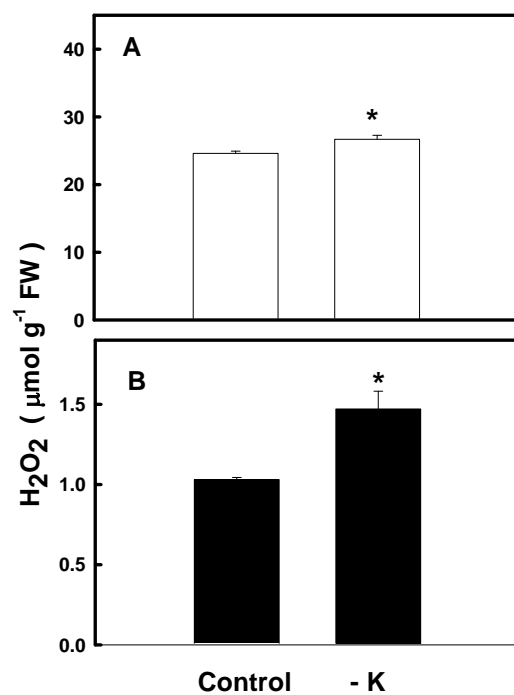


圖 4. 缺鉀 (-K) 對水稻幼苗第二片葉片 (A) 及地下部 (B) H₂O₂ 含量之影響。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。*表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

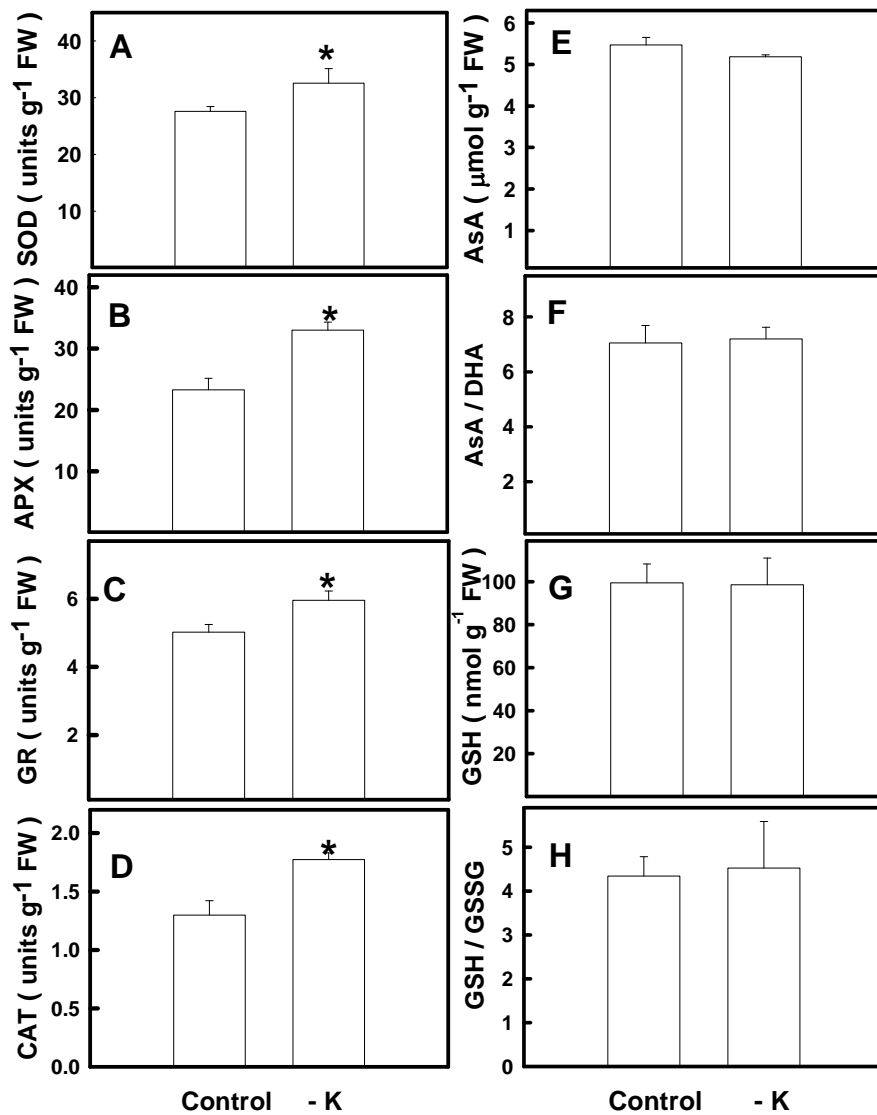


圖 5. 缺鉀 (-K) 對水稻幼苗第二片葉片抗氧化酵素 SOD (A)、APX (B)、GR (C)、CAT (D) 活性及抗氧化物 AsA (E)、DHA/AsA (F)、GSH (G)、GSSG/GSH (H) 與 GSSG (F) 含量之影響。於第三片葉片完全展開後進行測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。* 以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。* 表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

顯著降低缺鉀所誘導之水稻幼苗第二片葉片 H_2O_2 含量的累積 (圖 6A)，並且顯著降低缺鉀所誘導抗氧化酵素 SOD (圖 6B)，APX (圖 6C)，GR (圖 6D) 及 CAT 活性 (圖 6E) 之提升。這些結果顯示，缺鉀所誘導水稻幼苗 H_2O_2 含量之累積可能是透過活化 NADPH oxidase 之活性，並且缺鉀所誘導抗氧化酵素之提升可能是經由 H_2O_2 所調控。

(四) 缺鉀處理對水稻幼苗葉片 ABA 含量之影響

ABA 為植物逆境荷爾蒙。以 RT-PCR 檢測對 ABA 敏感之 *OsRab16A* 基因，結果發現缺鉀處理之水稻幼苗，其第二片葉片之 *OsRab16A* 基因表現量明顯增加 (圖 7A)。以 ELISA 測定結果亦發現缺鉀之水稻幼苗，其第二片葉片之 ABA 含量明顯增加 (圖 7B)。

(五) 外加 tungstate 對缺鉀水稻幼苗葉片 ABA、 H_2O_2 含量及抗氧化酵素活性之影響

欲瞭解缺鉀處理所導致水稻幼苗葉片 H_2O_2 含量及抗氧化酵素活性之增加是否與逆境賀爾蒙 ABA 之累積有關，待缺鉀處理之水稻幼苗生長至第三葉片葉完全展開，額外處理 1 天或 2 天 ABA 之合成抑制劑 tungstate，分析第二片葉片 ABA 及 H_2O_2 含量變化與抗氧化酵素之活性。結果發現，1 天之 tungstate 處理能顯著降低缺鉀所誘導之水稻幼苗葉片 ABA 含量的累積 (圖 8A, B)，而 2 天之 tungstate 處理能顯著降低缺鉀所誘導 H_2O_2 含量 (圖 9A) 及抗氧化酵素 SOD (圖 9B)，APX (圖 9C)，GR (圖 9D) 及 CAT 活性 (圖 9E) 之提升。這些結果顯示，缺鉀處理所導致水稻幼苗 H_2O_2 含量之累積與抗氧化酵素活性之提升，可能是經由 ABA 累積所造成。

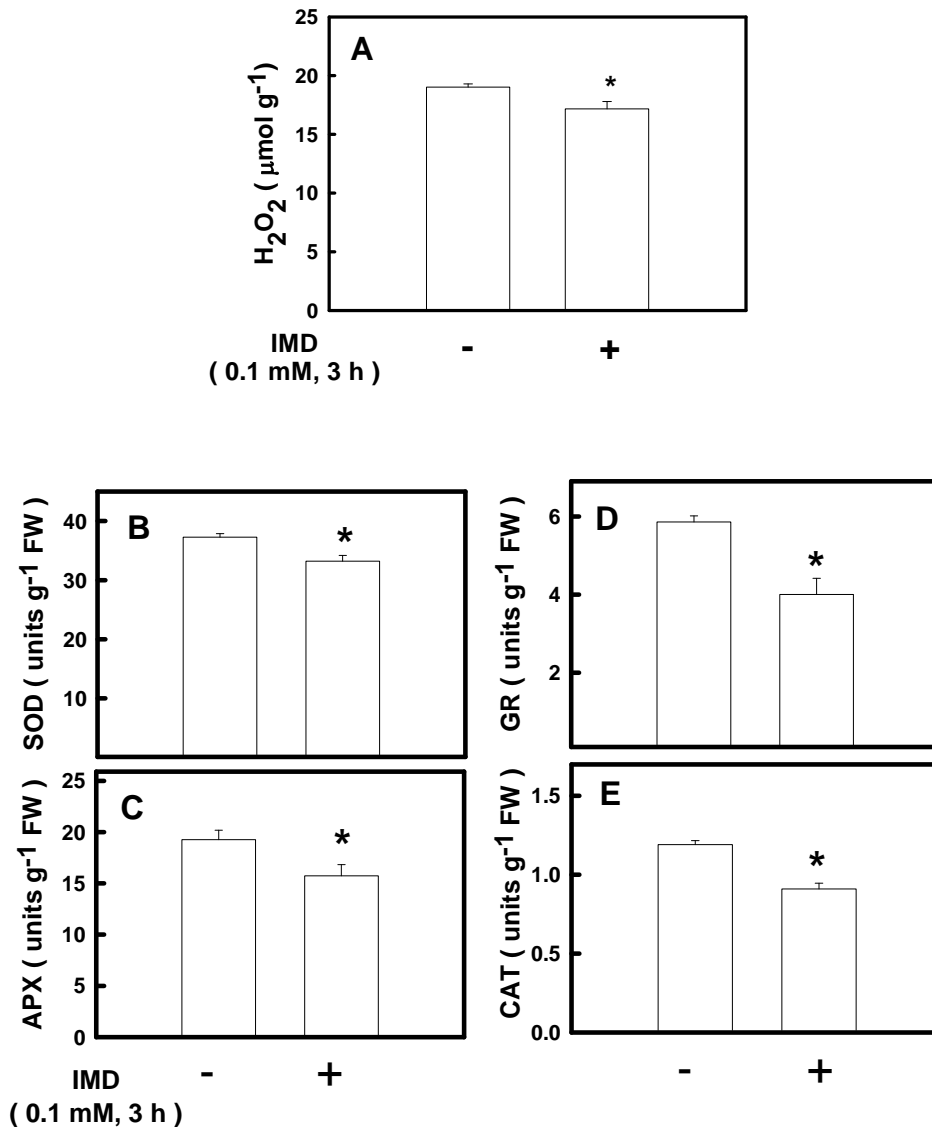


圖 6. 外加 IMD 處理對缺鉀 (-K) 水稻幼苗第二片葉片抗氧化酵素 SOD (A)、APX (B)、GR (C)、CAT (D) 活性之影響。待缺鉀處理之幼苗生長至第三葉完全展開後，以 0.1 mM IMD 處理 6 小時再進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。*以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。*表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

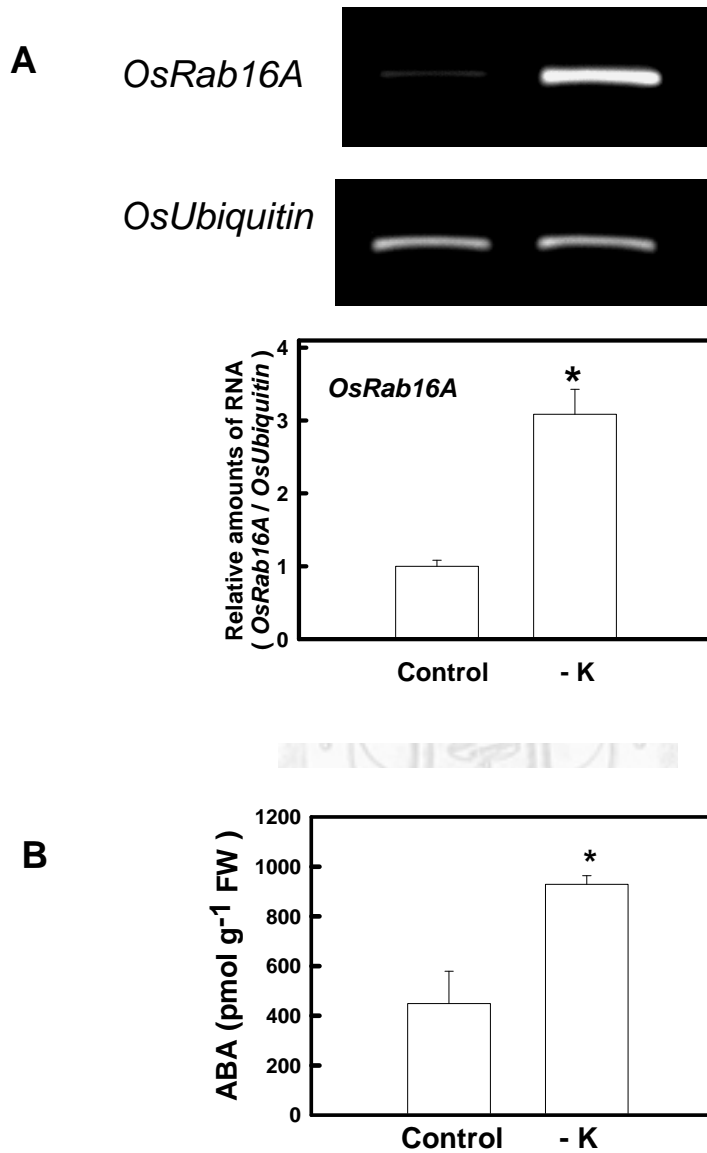


圖 7.缺鉀(- K)對水稻幼苗第二片葉片脫落酸含量之影響。*OsRab16A* 基因表現(A)與 ELISA 法(B)測定脫落酸含量。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。*表示有顯著差異($P < 0.05$)。

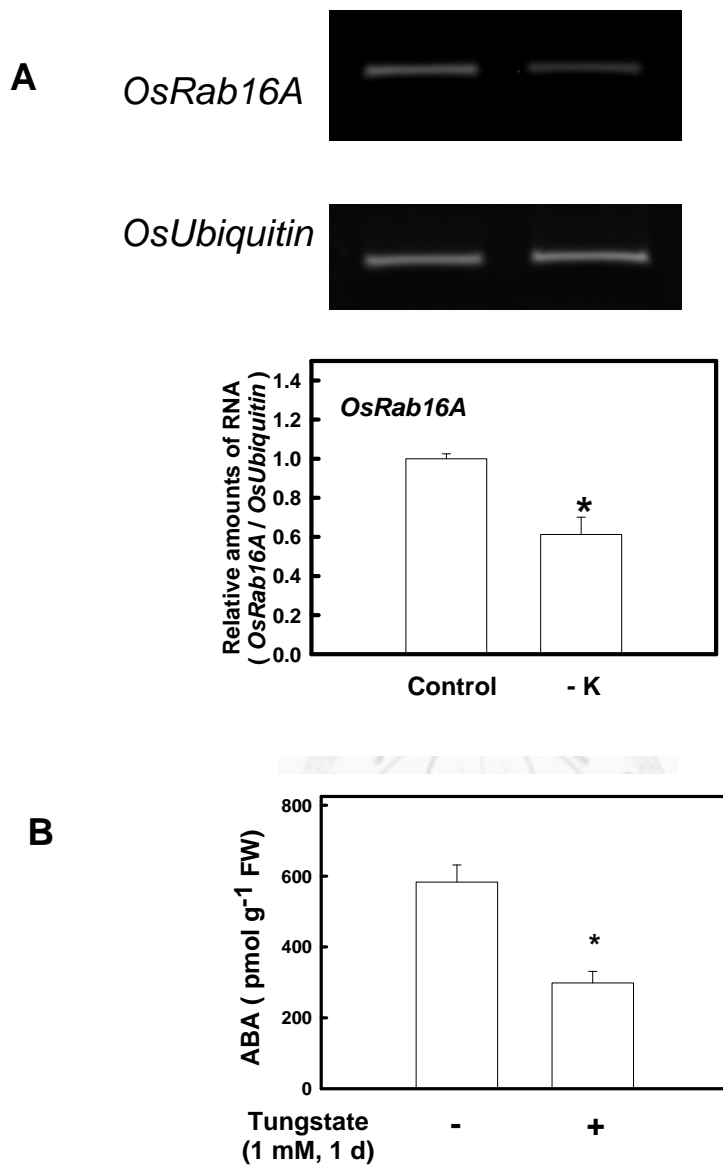


圖 8. 外加 tungstate 處理對缺鉀 (- K) 水稻幼苗第二片葉片脫落酸含量之影響。*OsRab16A* 基因表現(A)與 ELISA 法(B)測定脫落酸含量。待缺鉀處理之幼苗生長至第三葉完全展開後，以 1 mM tungstate 處理 1 天再進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。* 表示有顯著差異($P < 0.05$)。

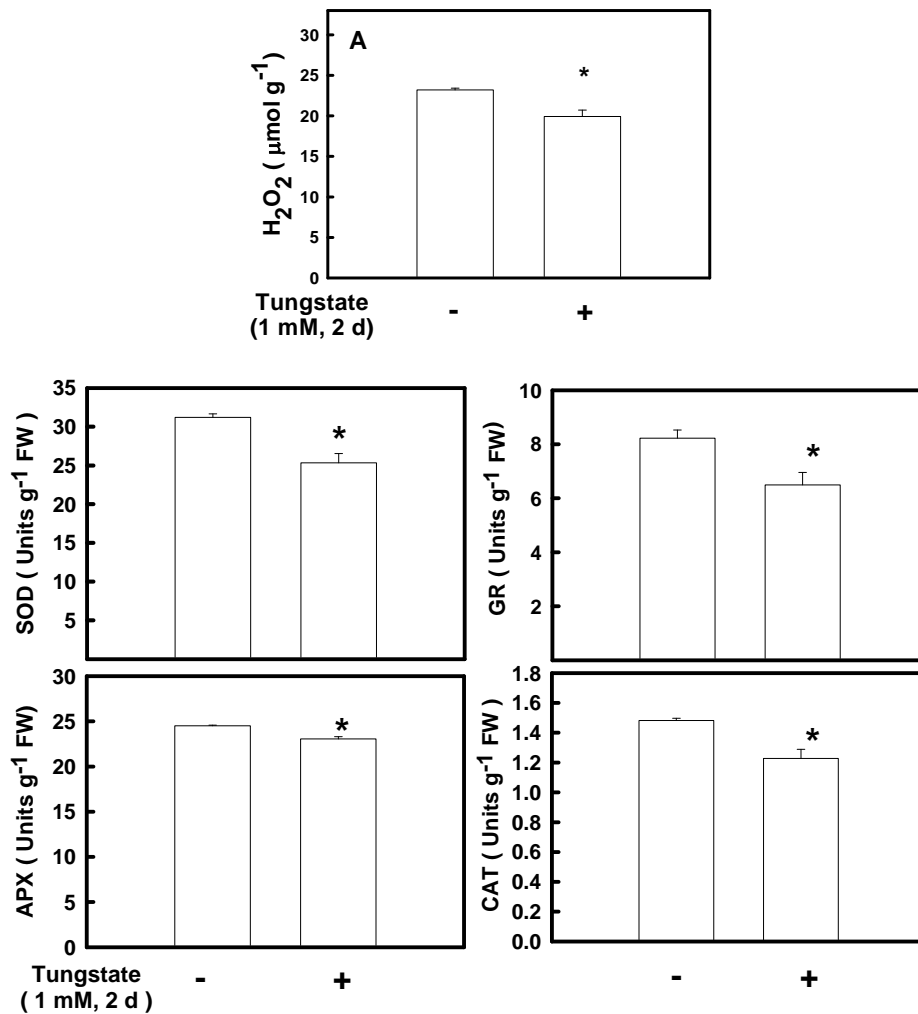


圖 9. 外加 tungstate 處理對缺鉀 (- K) 水稻幼苗第二片葉片 H₂O₂ 含量(A)及抗氧化酵素 SOD (B)、APX (C)、GR(D)、CAT (E) 活性之影響。待缺鉀處理之幼苗生長至第三葉完全展開後，以 1 mM tungstate 處理 2 天再進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。*以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。*表示有顯著差異($P < 0.05$)。

(六) 缺鉀對水稻幼苗經後續鎘處理之影響

欲瞭解缺鉀與鎘逆境雙重效應對水稻幼苗之影響，待正常及缺鉀處理之水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含或不含 5 μM 氯化鎘之正常或缺鉀水耕液，生長 6 天後，觀察水稻幼苗外觀，同時分析第二片葉片之 MDA 含量。結果顯示，與正常水耕栽培之幼苗比較，缺鉀處理之水稻幼苗經後續鎘處理，可減緩鎘所引起之第二片葉片黃化 (圖 10A) 與 MDA 含量之累積 (圖 10B)。

(七) 缺鉀處理對水稻幼苗之鎘吸收的影響

欲瞭解缺鉀處理是否會影響水稻幼苗對鎘之吸收，待正常及缺鉀處理之水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含或不含 5 μM 氯化鎘之正常或缺鉀水耕液，生長 6 天後，分析水稻地上部和地下部之鎘含量。結果發現缺鉀水稻幼苗經後續鎘處理，其地上部之鎘含量明顯高於對照幼苗 (圖 11A)，但是地下部之鎘含量反而低於對照幼苗 (圖 11B)。以上結果顯示，缺鉀處理可能會影響鎘在水稻幼苗之地上部和地下部的分佈。

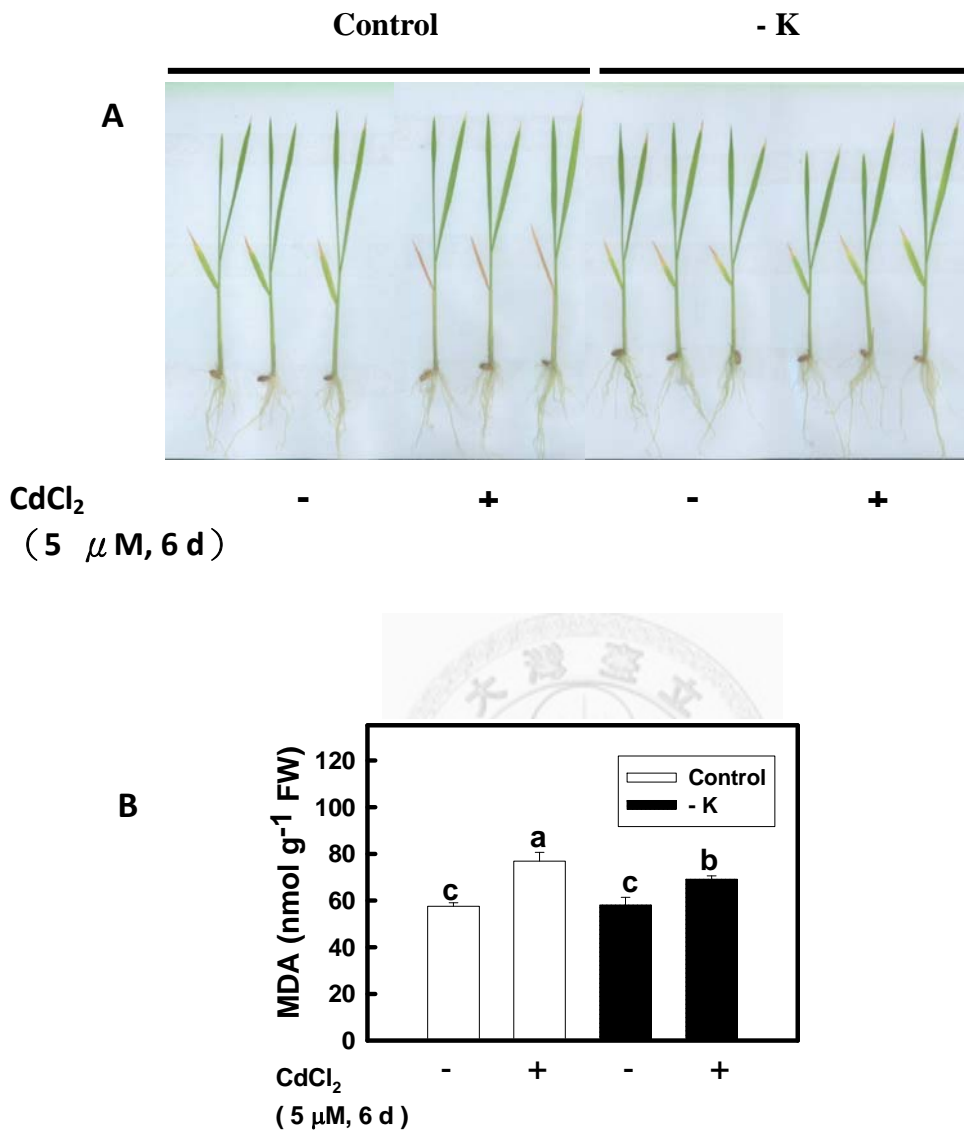


圖 10. 缺鉀 (- K) 與氯化鎘處理對水稻幼苗外觀 (A) 與第二片葉片 MDA 含量 (B) 之影響。待對照與缺鉀處理之幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液，6 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

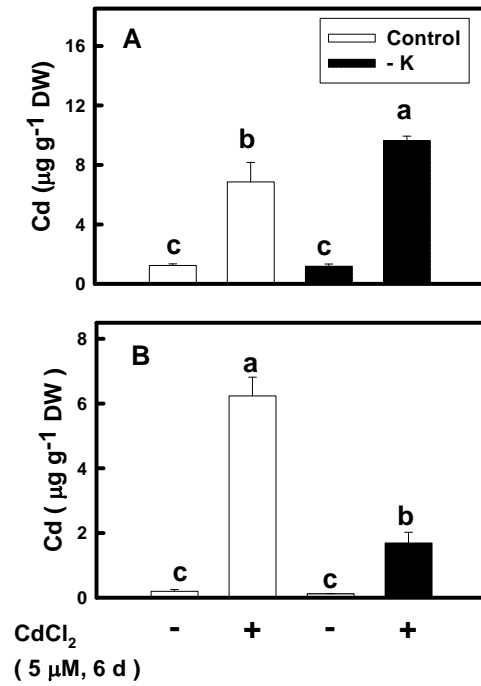


圖 11. 缺鉀 (-K) 與氯化鎘處理對水稻幼苗地上部 (A) 及地下部 (B) 鎘含量之影響。待對照與-K 處理之幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移到含與不含 5 µM 氯化鎘水耕液，6 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

二、鎘毒害對水稻幼苗鉀離子吸收之影響

(一) 鎘處理對水稻幼苗 TN1 及 TNG67 外觀、葉綠素與 MDA 含量之影響

欲瞭解不同水稻品種對鎘之耐受性，使用兩種水稻品種，其中 TN1 為對鎘敏感之品種，TNG67 為對鎘較不敏感之品種。待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含或不含 5 μM 氯化鎘之水耕液，生長 6 天後，觀察水稻幼苗外觀，分析第二片葉片之葉綠素和 MDA 含量。結果發現，6 天之鎘處理，造成 TN1 水稻幼苗第二片葉片黃化 (圖 12A)，葉綠素含量大幅下降 (圖 12C)，MDA 含量顯著上升 (圖 12E)，但對於 TNG67 水稻幼苗，比較未經鎘處理之對照幼苗，不論在第二片葉片之外觀 (圖 12B)，葉綠素含量 (圖 12D)，以及 MDA 含量 (圖 12E)，均沒有顯著差異。這些結果顯示，TNG67 為耐鎘之水稻品種。

(二) 鎘處理對水稻幼苗 TN1 及 TNG67 之鎘含量的影響

欲探討 TN1 與 TNG67 水稻幼苗對鎘之耐受性的差異，是否是因對鎘吸收之程度不同而導致，待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含或不含 5 μM 氯化鎘之水耕液，生長 6 天後，分析水稻幼苗地上部和地下部之鎘含量。結果發現，TN1 幼苗地上部之鎘含量約為 TNG67 之兩倍 (圖 13A, C)，地下部之鎘含量約為 TNG67 之五倍 (圖 13B, D)。這些結果顯示，TN1 所受到之鎘毒害較 TNG67 為明顯，可能是因為 TN1 水稻幼苗所累積之鎘含量較高所致。

(三) 鎘處理對水稻幼苗 TN1 及 TNG67 之鉀含量的影響

鉀為植物生長所需之大量元素之一，欲探討 TN1 與 TNG67 水稻幼苗對鎘之耐

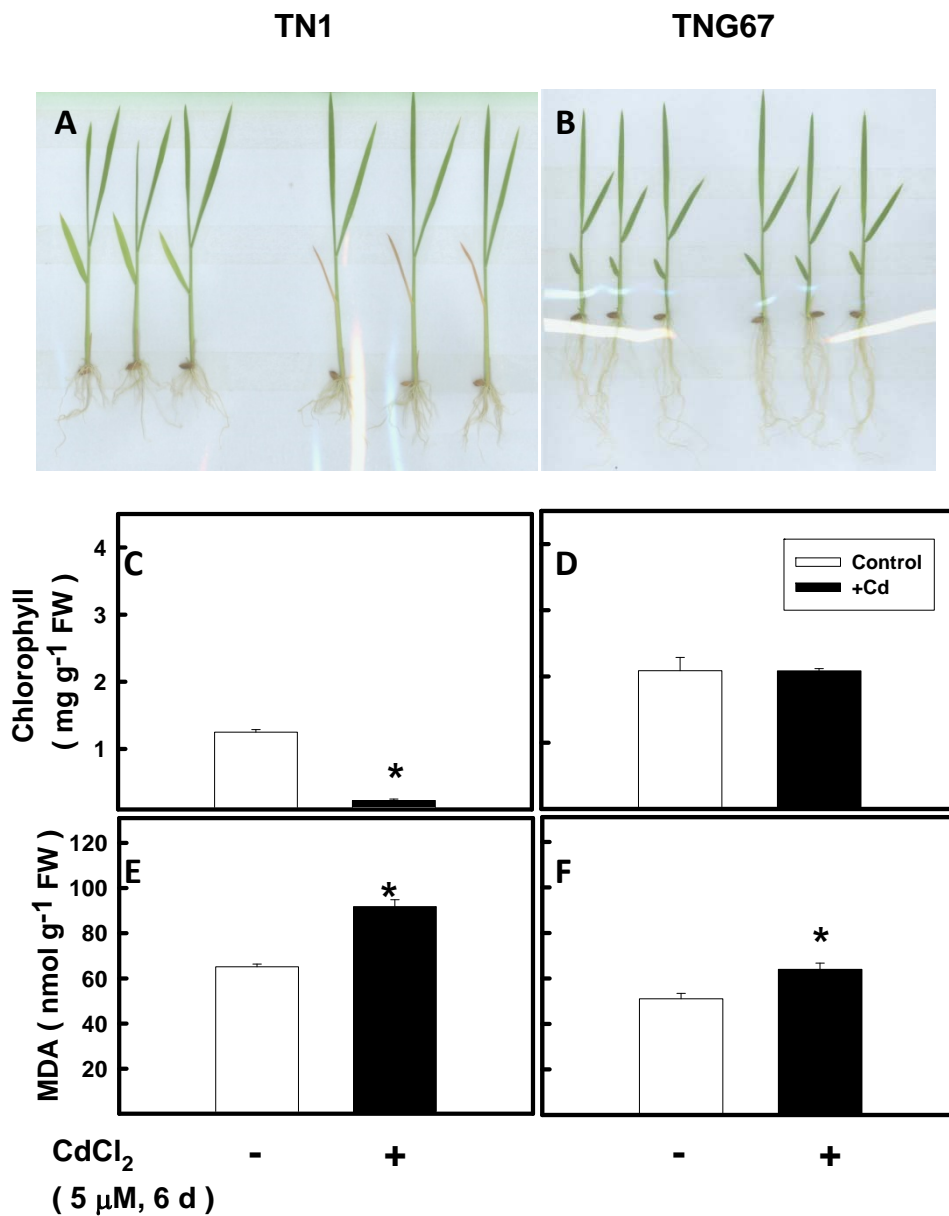


圖 12. 氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 及 TNG67 外觀 (A, B)、第二片葉片葉綠素 (C, D) 與 MDA 含量 (E, F) 之影響。待幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液，6 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

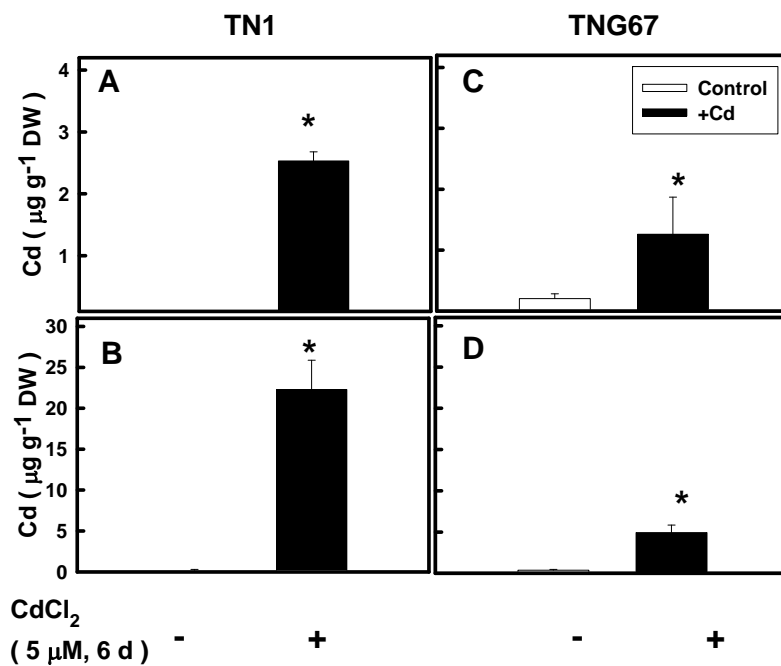


圖 13. 氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 及 TNG67 地上部 (A, C) 及地下部 (B, D) 鎘含量之影響。待幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移到含與不含 5 µM 氯化鎘水耕液，6 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

受性的差異，是否是因鎘毒害引起之鉀含量下降而導致，待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含或不含 $5 \mu\text{M}$ 氯化鎘之水耕液，生長 6 天後，分析水稻幼苗第二片葉片、地上部和地下部之鉀含量。結果發現，TN1 幼苗經 6 天之鎘處理，其第二片葉片、地上部及地下部之鉀含量均顯著下降（圖 14A, B, C），但 TNG67 幼苗之鉀含量，不論在第二片葉片、地上部或地下部（圖 14D, E, F），比起未經鎘處理之對照幼苗，均沒有顯著差異。這些結果顯示，TN1 對鎘之耐受性較 TNG67 為低，可能是因為鎘毒害所引起 TN1 水稻幼苗之鉀含量下降所致。

（四）鎘與鉀處理對水稻幼苗 TN1 幼苗之 MDA 與葉綠素含量的影響

欲進一步探討對鎘敏感之 TN1 水稻品種，是否是因鎘毒害所引起之鉀含量下降所致，待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含 $5 \mu\text{M}$ 氯化鎘以及含或不含 $100 \mu\text{M}$ 氯化鉀之水耕液，生長 6 天後，分析水稻幼苗第二片葉片之葉綠素和 MDA 含量。結果發現，經 6 天之鎘處理，外加 $100 \mu\text{M}$ 氯化鉀能顯著降低鎘所引起之葉綠素含量下降及 MDA 含量之上升（圖 15A, B）。

（五）鎘處理外加鉀處理對水稻幼苗 TN1 之鎘與鉀含量的影響

接續前一項試驗結果，欲探討外加鉀處理能顯著降低 TN1 水稻幼苗之鎘毒害，是否是因鉀處理能增加幼苗之鉀含量並降低對鎘之吸收，待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含 $5 \mu\text{M}$ 氯化鎘以及含或不含 $100 \mu\text{M}$ 氯化鉀之水耕液，生長 6 天後，分析水稻幼苗地上部和地下部之鉀含量和鎘含量。結果發現，經 6 天之鎘處理，外加 $100 \mu\text{M}$ 氯化鉀能顯著增加 TN1 水稻幼苗之地上部和地下部的鉀含量（圖 16C, D），並顯著降低幼苗地上部和地下部對鎘之吸收（圖 16A, B），進一步證實對鎘敏感之 TN1 水稻品種，鎘處理會影響幼苗對鉀之吸收而造成毒害。

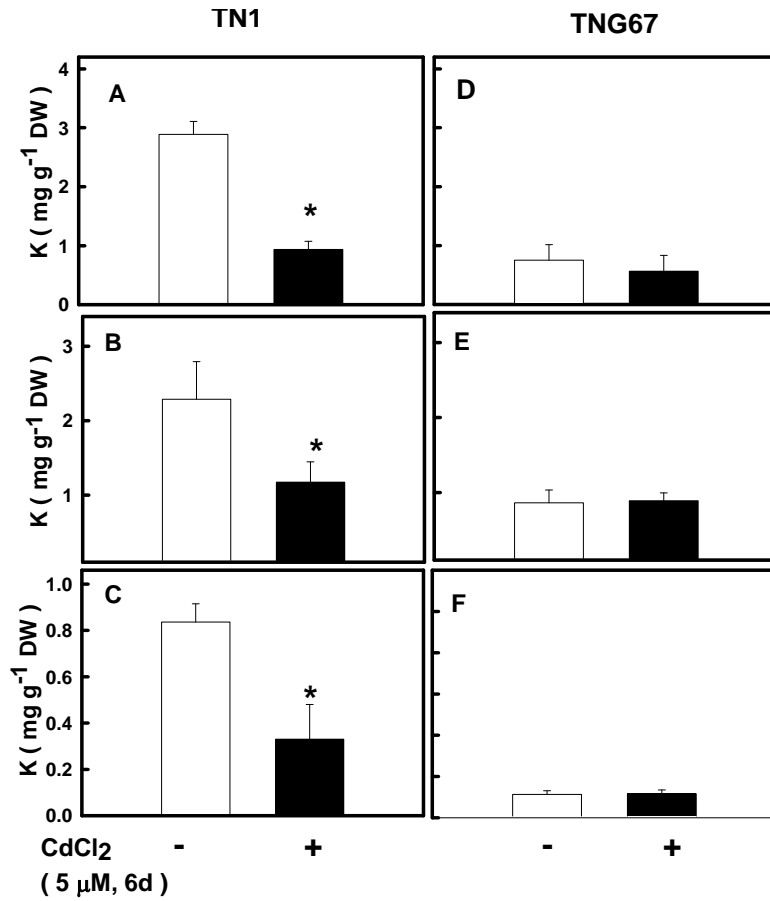


圖 14. 氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 及 TNG67 第二葉 (A, D)、地上部 (B, E) 及地下部 (C, F) 鉀含量之影響。待幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移到含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液，6 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

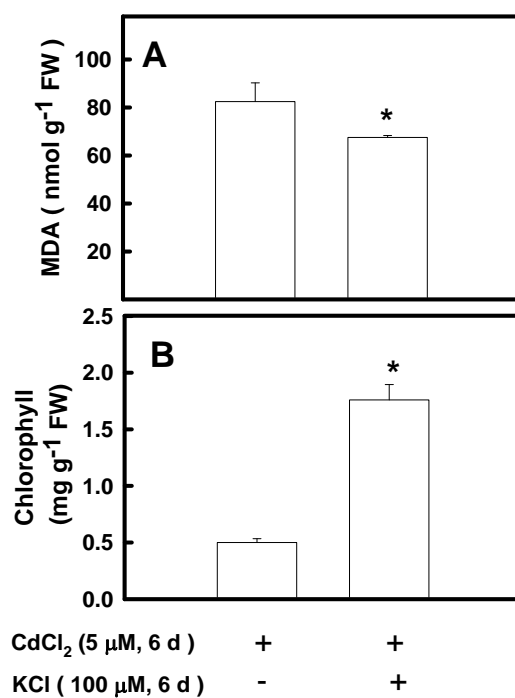


圖 15. 氯化鉀與氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 第二片葉片 MDA(A)與葉綠素(B)含量之影響。待幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含與不含 5 μM 氯化鎘及 100 μM 氯化鉀水耕液，6 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

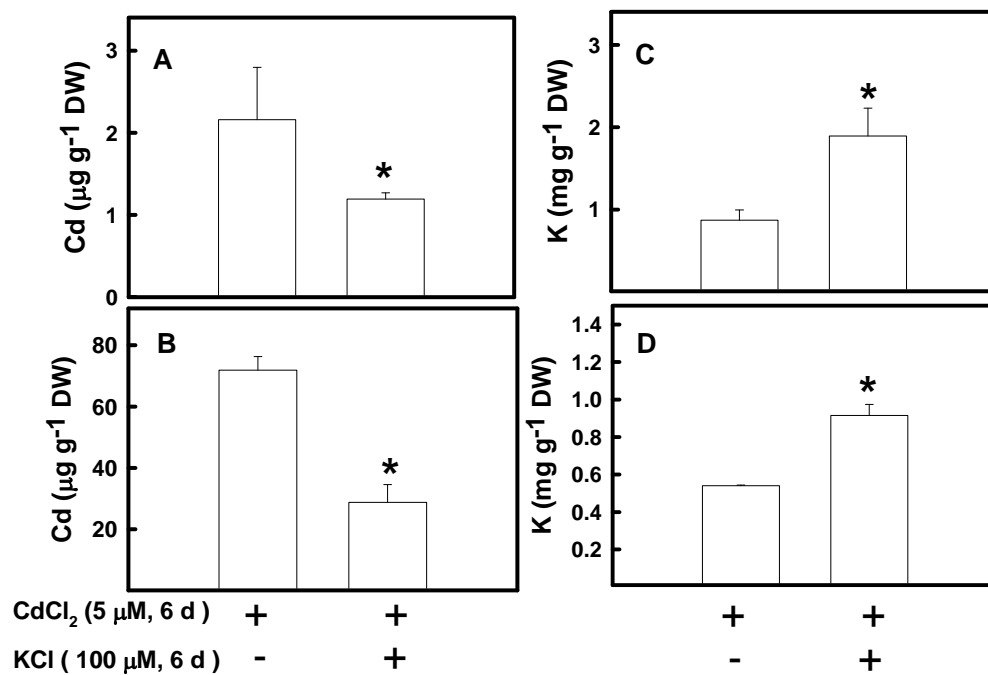


圖 16. 氯化鉀與氯化鎘處理對水稻幼苗 TN1 地上部 (A, C) 與地下部 (B, D) 之鎘含量與鉀含量的影響。待幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移至含與不含 5 μM 氯化鎘及 100 μM 氯化鉀水耕液，6 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 Student's *t*-test 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

討論

一、鎘對缺鉀水稻幼苗之影響

鉀為植物生長之大量元素之一，且為植物細胞中含量最豐富的陽離子(Leigh & Jones, 1984; Véry & Sentenac, 2003)，對於細胞及植物組織中滲透壓之調節、酸鹼值平衡、酵素活化、氣孔張合、細胞生長等，鉀離子均扮演重要的角色(Marschner, 2002)。過去研究發現，缺鉀會抑制植物生長，使植株變為矮小(Cakmak, 1994; Zhao *et al.*, 2001)，若在高光強下伴隨缺鉀處理，會造成葉片黃化(Marschner & Cakmak, 1989)。本論文試驗結果亦發現，生長於缺鉀水耕液之水稻幼苗，第二片葉片、地上部和根部之鉀含量明顯下降（圖 3A, B, C），植株較正常幼苗矮小，且第二片葉片之葉尖有黃化現象（圖 2）。

鉀在高等植物的光合作用中，也扮演相當重要的角色。過去研究指出，缺鉀會影響到植物之光合作用效率(Bednarz & Oosterhuis, 1999a; Zhao *et al.*, 2001; Weng *et al.*, 2007)，由於二氧化碳固定作用受到抑制，過多的電子便與氧分子結合，而形成大量的活化氧族(Weng *et al.*, 2007)。此外，缺鉀所導致活化氧族之大量形成亦與細胞膜上之 superoxide-generating NADPH-oxidase 之活化有關(Cakmak, 2005)。過去研究發現，水稻葉片在缺鉀情況下，光合作用受到抑制，活化氧族會大量形成(Weng *et al.*, 2007)。玉米和阿拉伯芥之葉片或根部在缺鉀時亦會增加活化氧族的累積(Shin & Schachtman, 2004)。本論文試驗結果發現，缺鉀會誘導水稻幼苗第二片葉片及根部之 H_2O_2 含量增加（圖 4A, B），並且外加 NADPH-oxidase 之抑制劑（IMD），能顯著降低因缺鉀所誘導 H_2O_2 含量之增加（圖 5A），指明缺鉀所誘導之 H_2O_2 含量的增加，可能部分是藉由增加 NADPH oxidase 之活性所導致。

活化氧族為植物生理代謝的副產物之一，在正常生長情況下，植物經由抗氧化系統之建立能清除這些活化氧族，避免造成氧化傷害(Mittler, 2002)。但在植物遭受逆境時，活化氧族之形成與清除的平衡機制受到破壞，過多的活化氧族大量形成，會傷害細胞中之DNA、脂質或蛋白質等大分子，而造成氧化逆境(Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004)。

過去研究發現，活化氧族會影響到細胞核中之基因轉錄作用，含示有訊息從這些胞器傳送到細胞核(Apel & Hirt, 2004)。過去多項研究均發現(Shin & Schachtman, 2004; Shin *et al.*, 2005; Gechev *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2009; Tanou *et al.*, 2009)，活化氧族在植物遭受逆境時可作為訊息分子，調控下游之生理反應。例如在乾旱逆境或鹽害逆境下，抗氧化酵素活性之提升，便是透過H₂O₂所調控(Lu *et al.*, 2009; Tanou *et al.*, 2009)。植物遭受病菌攻擊時所產生之細胞程序性死亡(programmed cell death)，以避免病菌在植物體內擴散，亦是經由活化氧族作用所致(Gechev *et al.*, 2006)。乾旱逆境下ABA所調控之氣孔的關閉，也是經由H₂O₂調控膜上之鈣離子通道，使鈣離子累積所致(Pei *et al.*, 2000)。此外，植物在缺乏無機離子時，活化氧族之形成亦可作為訊息分子來調控植物中多項基因之表現 (Schachtman & Shin, 2007)。例如缺磷、缺氮或缺鉀所誘導阿拉伯芥之轉運蛋白或其他相關酵素之基因表現，即是藉由H₂O₂所調控(Shin & Schachtman, 2004; Shin *et al.*, 2005)。目前在阿拉伯芥已發現有175種基因表現會受到H₂O₂的影響，其中有113種基因其表現會受H₂O₂所誘導，並且這些基因所轉譯出來之蛋白質，與抗氧化作用或是遭受逆境時之防禦反應有關(Desikan *et al.*, 2001)。

本研究室近年來亦發現 NaCl 所誘導之抗氧化酵素 GR 的基因，OsGR2 之表現受 H₂O₂ 所調控(Hong *et al.*, 2009)。此外，經熱休克前處理之水稻幼苗，H₂O₂ 含量

增加，亦能誘導抗氧化物 AsA 和 GSH 含量上升，以及抗氧化酵素 APX 和 GR 活性增加(Hsu & Kao, 2007b)。本論文試驗結果發現，缺鉀之水稻幼苗，其第二片葉片之抗氧化酵素 SOD、APX、GR 和 CAT 之活性會增加（圖 5A, B, C, D），但不影響到抗氧化物 AsA（圖 5E,F）與 GSH（圖 5G,H）。並且外加 IMD 不僅抑制缺鉀所誘導 H₂O₂ 含量的增加，亦會抑制缺鉀所誘導抗氧化酵素活性之提升，這些結果顯示缺鉀所誘導 H₂O₂ 之累積，與抗氧化酵素活性之提升有關，亦即缺鉀所誘導之 H₂O₂，可作為訊息分子，調控下游抗氧化酵素活性之提升。

ABA 為植物逆境荷爾蒙，在植物遭受逆境時，ABA 作為訊息分子，能調整植物之代謝過程，以適應不良環境(Leung & Giraudat, 1998)。植物在缺乏生長所需之無機離子時，ABA 含量之累積亦會影響到植物下游之生理代謝途徑(Mizrahi & Richmond, 1972; Radin, 1984; Peuke *et al.*, 1994; Jaschke *et al.*, 1997; Vysotskaya *et al.*, 2008)。例如蓖麻在缺鉀時，ABA 在根部的合成量會增加，從根部至地上部之 ABA 輸送量可增加至正常情況下之 4.6 倍(Peuke *et al.*, 1994)。另有研究發現，在鹽害逆境下或外加 ABA 處理於水稻胚、葉片、根、以及懸浮細胞，可誘導 *Rab16A* 之基因表現(Mundy & Chua, 1988)，並且在鹽害或乾旱逆境下，大量表現 *Rab16A* 之菸草轉植株，對鹽害逆境之耐受性亦提高(RoyChoudhury *et al.*, 2007)。本論文試驗結果亦發現，不論以 *Rab16A* 基因表現（圖 7A）或 ELISA（圖 7B）測定 ABA 含量，缺鉀均會造成水稻幼苗之第二片葉片 ABA 含量顯著提升。

過去多項研究均指出，ABA 能促進活化氧族在植物細胞中的形成。不論在阿拉伯芥(Pei *et al.*, 2000)或蠶豆之保衛細胞(Zhang *et al.*, 2001)、玉米之胚細胞(Guan *et al.*, 2000)和玉米幼苗之葉片(Jiang & Zhang, 2001)，甚至乾旱逆境下之百慕達草(Lu *et al.*, 2009)，ABA 均會誘導活化氧族之形成。並且 ABA 所誘導活化氧族之形成，可能是經由活化細胞膜上之 NADPH oxidase (Jiang & Zhang, 2001; Jiang &

Zhang, 2002; Neill *et al.*, 2002)。本論文試驗結果亦發現，缺鉀所誘導之 H_2O_2 含量的增加，可能與 ABA 含量之累積有關 (圖 9A)，並且缺鉀所誘導之抗氧化酵素之提升，亦與 ABA 之累積有關 (圖 9B)。由於 NADPH oxidase 之活性抑制劑 (IMD) 能顯著降低缺鉀所誘導 H_2O_2 含量和抗氧化酵素活性之提升 (圖 6A, B, C, D, E)，因此 ABA 在缺鉀水稻幼苗之累積，可能是透過活化 NADPH oxidase 之活性，而誘導 H_2O_2 含量增加，並進一步導致抗氧化酵素活性提升。

過去研究發現菜豆隨缺鉀處理時間增加，其葉片之 peroxidase 活性亦隨之增加 (Cakmak, 1994)。本研究室過去研究亦發現，水稻幼苗根部 ABA 之累積以及 ABA 所誘導之 H_2O_2 含量的增加，可能與 peroxidase 活性之提升有關 (Lin & Kao, 2001)。本論文試驗結果發現，缺鉀水稻幼苗之根部及葉片，均有 H_2O_2 累積之現象 (圖 4A, B)，因此缺鉀水稻幼苗葉片之 ABA 含量的累積，與其所調控 H_2O_2 之形成，亦可能透過活化 peroxidase 之活性 (Cakmak, 2005)，但此部分推測仍有待更直接之證據證明。

自十八世紀工業革命以來，大量工廠隨之興起，但也伴隨重金屬污染河川及人類居住的環境。鎘密度大於 5 g/cm^3 ，為造成工業污染的重金屬之一。根據 Wagner (1993) 之評估，一般未遭污染之土壤的鎘含量約為 0.04 至 $0.32 \mu\text{M}$ ，土壤鎘含量在 0.32 至 $1 \mu\text{M}$ 視為中度污染，若土壤鎘含量高達 $35 \mu\text{M}$ ，只有對鎘具高耐受性之品種，如十字花科之 *Thlaspi caerulescens* (Brown *et al.*, 1994)，才能生存。因此本論文鎘處理試驗均以 $5 \mu\text{M}$ 之氯化鎘，直接添加於水耕液中進行鎘處理。

鎘在細胞中之累積會誘導活化氧族等有害分子的形成 (Assche & Clijsters, 1990) 而造成氧化逆境，影響到蛋白質之代謝 (Tamás *et al.*, 1997)、膜系之完整性及功能 (membrane functioning) (Azevedo *et al.*, 2005)、光合作用之效率 (Bazzaz *et al.*, 1974)

等等，並使得植物外觀黃化或生長受抑制(Das *et al.*, 1997)。因此目前研究上有數種指標，來呈現鎘逆境所造成之氧化傷害，如葉片黃化、生物量之降低、葉綠素或蛋白質含量下降、MDA 含量上升或銨離子之累積等(Hsu & Kao, 2005)。本論文試驗則是以水稻幼苗第二片葉片之黃化程度、葉綠素含量之下降與 MDA 含量之上升作為鎘毒害之指標。試驗結果發現，缺鉀之水稻幼苗可以減緩後續之鎘毒害(圖 10A, B)。Cakmak 亦發現，缺鉀能降低菜豆所受到 paraquat(PQ)引起之氧化傷害(Cakmak, 1994)。

作物在田間所遭受的逆境為多重而非單一逆境，並且最影響作物生長及產量者，往往為這些逆境同時發生所造成的結果。Mittler(2006)提出多重逆境間具有交互作用的概念，指出植物對於兩種逆境交互作用下的反應為獨一的，而非直接從植物對單一逆境的反應來推斷。過去多項研究多著重於單一逆境之探討，但是最貼近實際田間或自然環境發生之情形，卻是多重逆境對作物之影響。本研究室近年來亦著手於雙重逆境之探討。對鎘並對高濃 ABA 敏感之水稻幼苗，在高溫下伴隨鎘處理，可能由於 ABA 含量增加，導致所受到之鎘毒害更為嚴重(Hsu & Kao, 2008)。而水稻幼苗於缺氮(林雅琳, 2008)或缺硫(郭俊伶, 2008)伴隨鎘處理，可能由於抗氧化酵素活性及抗氧化物含量均下降，導致鎘所造成之氧化逆境更嚴重。但水稻幼苗若於缺鎂伴隨鎘處理(周庭邵, 2009)，可能由於抗氧化酵素活性及抗氧化物含量均上升，反而能減緩後續鎘處理所誘導之氧化傷害。本論文結果亦發現，水稻幼苗於缺鉀處理下，可能由於抗氧化酵素 SOD, APX, GR 及 CAT 之活性增加(圖 5A, B, C, D)，而減緩後續鎘處理所造成之氧化傷害(圖 10A, B)。

此外，鎘在植物中之運移可藉由蒸散作用從根部輸送至植物體內其他部位。由於缺鉀會造成水稻幼苗 ABA 含量增加，並且 ABA 在逆境下可作為訊息分子，調控保衛細胞膜上之鈣離子通道，使氣孔關閉而降低蒸散作用(Pei *et al.*, 2000)。因此

本論文試驗結果發現缺鉀可減緩後續之鎘毒害（圖 10A, B），亦可能藉由 ABA 之累積降低蒸散作用，使鎘吸收減少以減緩鎘毒害。但是本論文結果卻發現，缺鉀水稻幼苗地上部，即表現鎘毒害之部位，其鎘含量並未減少反而增加（圖 10A），進一步證明缺鉀所導致後續鎘毒害之減緩，並非由於鎘含量減少，而是經由抗氧化酵素活性增加所致。

綜合本論文第一部試驗結果，缺鉀水稻幼苗能減緩後續鎘毒害，其可能機制是藉由缺鉀所誘導 ABA 含量累積，活化細胞膜上之 NADPH oxidase，使 H₂O₂ 含量增加，進一步增加抗氧化酵素 SOD、APX、GR 和 CAT 活性，因此能減緩後續鎘處理所造成之氧化傷害，而非藉由降低對鎘之吸收（圖 17）。

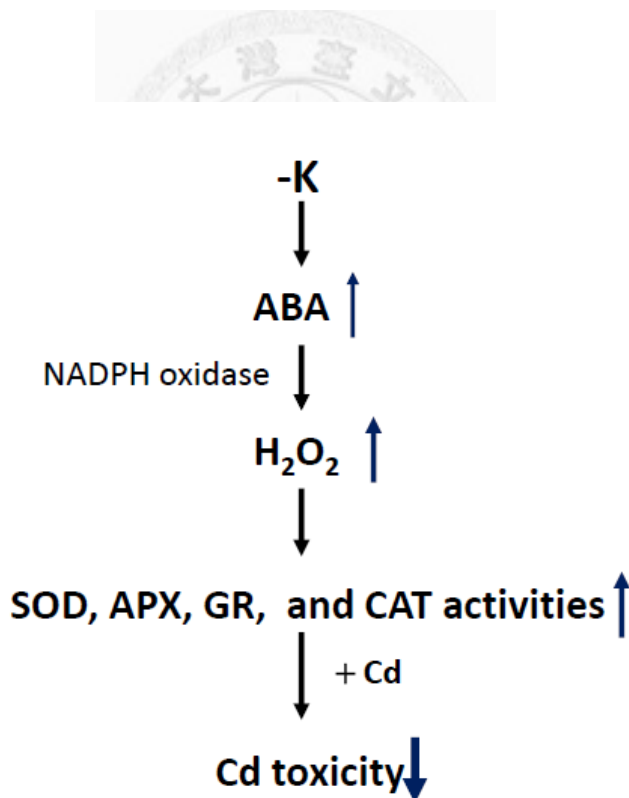


圖 17. 缺鉀水稻幼苗減緩鎘毒害之機制。↓表示降低，↑表示增加。

二、鎘毒害對水稻幼苗吸收鉀離子之影響

鎘不僅對植物體造成氧化傷害，其在土壤中之累積亦會影響到植物根部對其他生長元素之吸收(Hasan *et al.*, 2009)而造成毒害。例如鎘所造成之葉片黃化，即可能是因葉片缺鐵所致(Haghiri, 1973; Garty *et al.*, 1992)。Hewitt(1966)指出，化學或物理性質相似之元素在生物系統中可能會有拮抗作用，在細胞中可能會競爭同一個轉運蛋白或 storage site，在 reactive enzymatic protein 或 receptor protein 上會互相取代。由於鎘與數種植物生長元素同為陽離子，化學和物理性質相似，並且鎘非植物生長之必須元素，所以植物細胞並沒有特定的轉運蛋白來吸收鎘，鎘可能會與多種陽離子競爭細胞膜上之轉運蛋白，而進入植物細胞中。目前已知會與鎘競爭細胞膜上之陽離子轉運蛋白而進入細胞中者，包括鈣、鐵、鋅、錳等元素(Clemens, 2001)。因此過去多項研究均指出，鎘處理會影響生長元素在植物體內的含量，包括豌豆(Sandalio *et al.*, 2001)、阿拉伯芥(Smeets *et al.*, 2008; Besson-Bard *et al.*, 2009)及馬鈴薯(Gonçalves *et al.*, 2009)之銅、鋅、鐵、錳、鈣、鉀、鎂等離子含量。本論文試驗結果亦發現，對鎘敏感之水稻幼苗 TN1，對於鎘之吸收較 TNG67 為高，並且其鉀含量經鎘處理會顯著下降 (圖 14A, B, C)，TNG67 之鉀含量卻未受到影響，顯示水稻幼苗 TN1 之鎘毒害亦可能是由於鎘影響到幼苗對鉀之吸收所致。目前並未發現植物對鎘之吸收，會經由吸收鉀之轉運蛋白或離子通道。不過有研究發現，鎘會影響細胞內之鉀離子所誘導 membrane-bound ATPase 活性並抑制鉀離子吸收(Keck, 1978; Lindberg & Wingstrand, 1985)。此外細胞膜上亦有持續表現之 nonselective cation channels (NSCCs)，使陽離子經被動運輸至細胞中，其中有一些 NSCC 為對鉀親和力較低之鉀離子通道，鎘亦可能與鉀離子競爭類似之通道而導致鉀離子含量降低(Demidchik & Maathuis, 2007)。

既然鎘會與其他陽離子競爭以進入植物細胞，影響植物對生長元素之吸收而造成毒害，如果在鎘處理下，同時添加這些陽離子與鎘競爭，也許能夠降低植物細胞對鎘之吸收而減緩鎘毒害(Archana Sharma *et al.*, 1985)。John(1976)發現，若是在鎘處理下，提高鈣、鋅、鉀等陽離子在水耕液中的濃度，能夠降低萵苣和燕麥對鎘之吸收，並降低鎘所導致植株乾重之下降。本論文試驗結果亦發現，若同時處理鎘與鉀於栽培水耕液中，可能因為鉀含量提高(圖 16C, D)，鎘含量下降(圖 16A, B)，而造成鎘毒害下降(圖 15A, B)。

三、未來研究方向

本論文研究結果顯示，缺鉀水稻幼苗可減緩後續之鎘毒害，可能是藉由 ABA 所調控之 H_2O_2 累積，導致抗氧化酵素 SOD，APX，GR，CAT 活性提升所致(圖 17)。過去研究亦發現，前處理 H_2O_2 能減緩後續之鹽害逆境，與抗氧化酵素活性之提升有關(Tanou *et al.*, 2009)。乾旱逆境下同時處理 ABA 能減緩水分之散失及離子滲漏(ion leakage)，可能與 H_2O_2 所調控之抗氧化酵素活性增加有關(Lu *et al.*, 2009)。因此對於生長於正常水耕液之水稻幼苗，添加 ABA 於水耕液中是否能誘導 H_2O_2 含量增加，或是添加 H_2O_2 於水耕液中，是否能誘導抗氧化酵素活性之提升，以面對後續所發生之其他逆境，仍待進一步之研究。

此外，鎘會誘導活化氧族之大量形成，產生氧化逆境。本研究室過去發現，對鎘敏感之水稻品種 TN1，其抗氧化酵素 SOD、APX、GR 和 CAT 活性在鎘處理下高於耐鎘之水稻品種 TNG67(Kuo & Kao, 2004)。5 μ M 之氯化鎘處理可誘導抗氧化酵素 APX 和 GR 之活性提升(周庭邵, 2009)。因此鎘處理所誘導之 H_2O_2 ，是否亦能誘導抗氧化酵素活性之提升，有待進一步之研究。

參考文獻

- 戶刈義次 (1963) 作物學試驗法, pp. 159-176: 東京農業技術學會印行.
- 吳春才 (2005) 土壤缺鉀的原因剖析及其對策. *上海農業科技* **5**, 44-45.
- 周庭邵 (2009) 水稻幼苗鎘逆境生理之研究: 鎂或熱休克之效應, 國立台灣大學.
- 林雅琳 (2008) 水稻鎘逆境生理之研究: 氮或熱休克處理之效應, 國立台灣大學.
- 郭俊伶 (2008) 水稻幼苗鎘逆境生理之研究: 硫與熱休克之效應, 國立台灣大學.
- Alscher RG, Erturk N & Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1331-1341.
- Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR & Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 3460-3479.
- Apel K & Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.
- Archana Sharma, Anita Mukharjee & Talukder G (1985) Modification of cadmium toxicity in biological systems by other metals. *Current Science* **54**, 539.
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 601-639.
- Asagba S, Eriyamremu G & Igberaese M (2008) Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiology and Biochemistry* **34**, 61-69.
- Assche F & Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* **13**, 195-206.
- Azevedo H, Pinto CGG & Santos C (2005) Cadmium effects in sunflower: membrane permeability and changes in catalase and peroxidase activity in leaves and calluses. *Journal of Plant Nutrition* **28**, 2233 - 2241.
- Bannister JV, Bannister WH & Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **22**, 111 - 180.
- Bazzaz FA, Carlson RW & Rolfe GL (1974) The effect of heavy metals on plants: Part I. Inhibition of gas exchange in sunflower by Pb, Cd, Ni and Ti. *Environmental Pollution* **7**, 241-246.
- Bednarz CW & Oosterhuis DM (1999a) Physiological changes associated with potassium

- deficiency in cotton. *Journal of Plant Nutrition* **22**, 303 - 313.
- Bednarz CW & Oosterhuis DM (1999b) Physiological changes associated with potassium deficiency in cotton. *Journal of Plant Nutrition* **22**, 303 - 313.
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou J-P, Pugin A & Wendehenne D (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in Arabidopsis by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* **149**, 1302-1315.
- Bowler C & Fluhr R (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science* **5**, 241-246.
- Bowler C, Montagu MV & Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 83-116.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248.
- Brown SL, Chaney RL, Angle JS & Baker AJM (1994) Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and *Bladder Campion* for zinc- and cadmium-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* **23**, 1151-1157.
- Cakmak I (1994) Activity of ascorbate-dependent H₂O₂-scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium- and potassium-deficient leaves, but not in phosphorus-deficient leaves. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1259-1266.
- Cakmak I (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**, 521-530.
- Cardinale F, Meskiene I, Ouaked F & Hirt H (2002) Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell* **14**, 703-711.
- Charles SA & Halliwell B (1981) Light activation of fructose biphosphatase in isolated spinach chloroplasts and deactivation by hydrogen peroxide. *Planta* **151**, 242-246.
- Chen LM & Kao CH (1999) Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **40**, 283.
- Chen SL & Kao CH (1995a) Glutathione reduces the inhibition of rice seedling root growth caused by cadmium. *Plant Growth Regulation* **16**, 249-252.
- Chen SL & Kao CH (1995b) Cd induced changes in proline level and peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **17**, 67-71.
- Chen SL & Kao CH (1995c) Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves. *Plant Science* **104**, 135-138.
- Chen SL & Kao CH (1995d) Glutathione reduces the inhibition of rice seedling root growth caused by cadmium. *Plant Growth Regulation* **16**, 249-252.

- Chien HF & Kao CH (2000) Accumulation of ammonium in rice leaves in response to excess cadmium. *Plant Science* **156**, 111-115.
- Chien HF, Lin CC, Wang JW, Chen CT & Kao CH (2002) Changes in ammonium ion content and glutamine synthetase activity in rice leaves caused by excess cadmium are a consequence of oxidative damage. *Plant Growth Regulation* **36**, 41-47.
- Chien HF, Wang JW, Lin CC & Kao CH (2001) Cadmium toxicity of rice leaves is mediated through lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation* **33**, 205-213.
- Clarkson DT & Hanson JB (1980) The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 239-298.
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475-486.
- Dangl JL, Dietrich RA & Richberg MH (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell* **8**, 1793-1807.
- Das P, Samantaray S & Rout GR (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution* **98**, 29-36.
- Degenhardt B & Gimmler H (2000) Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *Journal of Experimental Botany* **51**, 595-603.
- del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M & Barroso JB (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1255-1272.
- del Rio LA, Sandalio LM, Altomare DA & Zilinskas BA (2003) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **54**, 923-933.
- DeLand FH (1984) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 64th Edition: R. C. West, M. J. Astle, W. H. Beyer, Eds. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 1983, 2386 pp.
- Demidchik V & Maathuis FJM (2007) Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* **175**, 387-404.
- Desikan R, A. H. Mackerness S, Hancock JT & Neill SJ (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* **127**, 159-172.
- Fernando M, Kulpa J, Siddiqi MY & Glass ADM (1990) Potassium-dependent changes in the expression of membrane-associated proteins in barley roots : I. Correlations with K^+ ($^{86}Rb^+$) influx and root K^+ concentration. *Plant Physiology* **92**, 1128-1132.
- Ferretti M, Ghisi R, Merlo L, Dalla Vecchia F & Passera C (1993) Effect of cadmium on photosynthesis and enzymes of photosynthetic sulphate and nitrate assimilation pathways in maize (*Zea mays* L.). *Photosynthetica* **29**, 49-54.

- Foster JG & Hess JL (1980) Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant Physiology* **66**, 482-487.
- Fuhrer J (1982) Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* **70**, 162-167.
- Garty J, Karary Y & Harel J (1992) Effect of low pH, heavy metals and anions on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina duriaei* (de not.) bagl. *Environmental and Experimental Botany* **32**, 229-241.
- Gechev TS, Breusegem FV, Stone JM, Denev I & Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* **28**, 1091-1101.
- Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris P-C, Bouvier-Durand M & Vartanian N (1994) Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Molecular Biology* **26**, 1557-1577.
- Glinka Z & Reinhold L (1971) Abscisic acid raises the permeability of plant cells to water. *Plant Physiology* **48**, 103-105.
- Gonçalves JF, Antes FG, Maldaner J, Pereira LB, Tabaldi LA, Rauber R, Rossato LV, Bisognin DA, Dressler VL, de Moraes Flores ÉM & Nicoloso FT (2009) Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 814-821.
- Grant JJ & Loake GJ (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* **124**, 21-29.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ & Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**, 481-494.
- Guan LM, Zhao J & Scandalios JG (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal* **22**, 87-95.
- Gunse B, Llugany M, Poschenrieder C & Barcelo J (1992) Growth, cell wall elasticity and plasticity in *Zea mays* L. coleoptiles exposed to cadmium. *Suelo y Planta* **2**, 485-493.
- Gupta AS, Berkowitz GA & Pier PA (1989) Maintenance of photosynthesis at low leaf water potential in wheat: role of potassium status and irrigation history. *Plant Physiology* **89**, 1358-1365.
- Gussarsson M, Asp H, Adalsteinsson S & Jensen P (1996) Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulfoximine (BSO). *Journal of Experimental Botany* **47**, 211-215.

- H Peña-Cortés, J Fisahn & Willmitzer L (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4106-4113.
- Haghiri F (1973) Cadmium uptake by plants. *Journal of Environmental Quality* **2**, 93–96.
- Halliwell B (1987) Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids* **44**, 327-340.
- Hammond-Kosack KE & Jones JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* **8**, 1773-1791.
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA & Kochian LV (2002) Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. *Physiologia Plantarum* **116**, 73-78.
- Hasan SA, Fariduddin Q, Ali B, Hayat S & Ahmad A (2009) Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *Journal of Environmental Biology* **30**, 165-174.
- Hayakawa T, Kanematsu S & K A (1984) Occurrence of Cu–Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. *Plant & Cell Physiology* **25**, 883-889.
- Heath RL & Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts : I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189-198.
- Hewitt EJ (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. In *Technical Communication* Farnham Royal, UK Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Hong CY, Chao YY, Yang MY, Cheng SY, Cho SC & Kao CH (2009) NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid. *Plant and Soil* **320**, 103-115.
- Horton RF (1971) Stomatal opening: the role of abscisic acid. *Canadian Journal of Botany* **49**, 583-587.
- Hou SM & Kao CH (1993) Characteristics of the induction of the ethylene by cadmium in detached rice leaves. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **34**, 163-168.
- Hsu YT & Kao CH (2003a) Accumulation of ammonium ion in cadmium tolerant and sensitive cultivars of *Oryza sativa*. *Plant Growth Regulation* **39**, 271-276.
- Hsu YT & Kao CH (2003b) Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium. *Plant Growth Regulation* **40**, 147-155.
- Hsu YT & Kao CH (2003c) Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant, Cell & Environment* **26**, 867-874.
- Hsu YT & Kao CH (2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant*

Growth Regulation **42**, 227-238.

- Hsu YT & Kao CH (2005) Abscisic acid accumulation and cadmium tolerance in rice seedlings. *Physiologia Plantarum* **124**, 71-80.
- Hsu YT & Kao CH (2007a) Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines. *Plant and Soil* **291**, 27-37.
- Hsu YT & Kao CH (2007b) Heat shock-mediated H₂O₂ accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings. *Plant and Soil* **300**, 137-147.
- Hsu YT & Kao CH (2007c) Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant and Soil* **298**, 231-241.
- Hsu YT & Kao CH (2008) Distinct roles of abscisic acid in rice seedlings during cadmium stress at high temperature. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **49**, 335.
- Hsu YT, Kuo MC & Kao CH (2006) Cadmium-induced ammonium ion accumulation of rice seedlings at high temperature is mediated through abscisic acid. *Plant and Soil* **287**, 267-277.
- Ingram J & Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 377-403.
- Jana S & Choudhuri MA (1981) Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms: Effect of heavy metals. *Aquatic Botany* **11**, 67-77.
- Jaschke WD, Peuke AD, Pate JS & Hartung W (1997) Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1737-1747.
- Jiang M & Zhang J (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant & Cell Physiology* **42**, 1265-1273.
- Jiang M & Zhang J (2002) Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* **215**, 1022-1030.
- John MK (1976) Interrelationships between plant cadmium and uptake of some other elements from culture solutions by oats and lettuce. *Environmental Pollution* **11**, 85-95.
- Jordan-Meille L & Pellerin S (2008) Shoot and root growth of hydroponic maize (*Zea mays* L.) as influenced by K deficiency. *Plant and Soil* **304**, 157-168.
- Kabata-Pendias A & Pendias H (1984) *Trace elements in soils and plants*. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Keck RW (1978) Cadmium alteration of root physiology and potassium ion fluxes. *Plant Physiology* **62**, 94-96.
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J,

- Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E & Silva H (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8849-8855.
- Kuo MC & Kao CH (2004) Antioxidant enzyme activities are upregulated in response to cadmium in sensitive, but not in tolerant, rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **45**, 291.
- L. E. Hernandez, R. Carpena-Ruiz & Garate A (1996) Alternations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition* **19**, 1581-1598.
- Larsen J (1976) Untersuchungen über die Frostempfindlichkeit von Douglasienherkünften und über den Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Frostresistenz der Douglasie. *Forst-und Holzwirt* **15**, 299-302.
- Law MY (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochemical Journal* **210**, 899.
- Leigh RA & Jones RGW (1984) A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist* **97**, 1-13.
- Leung J & Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 199-222.
- Lin CC & Kao CH (2001) Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Science* **160**, 323-329.
- Lindberg S & Wingstrand G (1985) Mechanism for Cd²⁺ inhibition of (K⁺ + Mg²⁺)ATPase activity and K⁺ (⁸⁶Rb⁺) uptake in roots of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum* **63**, 181-186.
- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA & Baker A (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO Journal* **19**, 6770-6777.
- Lu S, Su W, Li H & Guo Z (2009) Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 132-138.
- M Kato & Shimizu S (1987) Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chloroplast degradation in senescing tobacco leaves: phenolic-dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany* **65**, 729-735.
- Maathuis FJM & Sanders D (1996) Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiologia Plantarum* **96**, 158-168.
- Marschner H (2002) *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd edition ed. Boston: Elsevier Science.
- Marschner H & Cakmak I (1989) High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of zinc, potassium and magnesium deficient bean (*Phaseolus vulgaris*)

- plants. *Journal of Plant Physiology* **134**, 308-315.
- McKenna IM, Chaney RL & Williams FM (1993) The effects of cadmium and zinc interactions on the accumulation and tissue distribution of zinc and cadmium in lettuce and spinach. *Environmental Pollution* **79**, 113-120.
- Metwally A, Safronova VI, Belimov AA & Dietz K-J (2005) Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany* **56**, 167-178.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**, 15-19.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M & Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490-498.
- Mizrahi Y & Richmond AE (1972) Abscisic acid in relation to mineral deprivation. *Plant Physiology* **50**, 667-670.
- Mullineaux PM & Creissen GP (1997) Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbour, NY.
- Mundy J & Chua NH (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *The EMBO Journal* **7**, 2279-2286.
- Nakano Y & Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **22**, 867-880.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD & Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237-1247.
- Noctor G & Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.
- Nogawa K & Kido T (1993) Biological monitoring of cadmium exposure in itai-itai disease epidemiology. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **65**, S43-S46.
- Ouariti O (1997) Responses of bean and tomato plants to cadmium: Growth, mineral nutrition, and nitrate reduction. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**, 347.
- Pál M, Horváth E, Janda T, Páldi E & Szalai G (2006) Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **169**, 239-246.
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A & Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts.

- Analytical Biochemistry* **154**, 536-541.
- Pei Z-M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E & Schroeder JI (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.
- Peuke AD, Jeschke WD & Hartung W (1994) The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. III. Long-distance transport of abscisic acid depending on nitrogen nutrition and salt stress. *Journal of Experimental Botany* **45**, 741-747.
- Peuke AD, Jeschke WD & Hartung W (2002) Flows of elements, ions and abscisic acid in *Ricinus communis* and site of nitrate reduction under potassium limitation. *Journal of Experimental Botany* **53**, 241-250.
- Pfluger R & Cassier A (1977) *Influence of monovalent cations on photosynthetic CO₂ fixation*. Horgen, Switzerland.
- Philippar K, Fuchs I, Lüthen H, Hoth S, Bauer CS, Haga K, Thiel G, Ljung K, Sandberg G, Böttger M, Becker D & Hedrich R (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12186-12191.
- Punz WF & Sieghardt H (1993) The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* **33**, 85-98.
- Radin JW (1984) Stomatal responses to water stress and to abscisic acid in phosphorus-deficient cotton plants. *Plant Physiology* **76**, 392-394.
- Rascio N, Dallavecchia F, Ferretti M, Merlo L & Ghisi R (1993) Some effects of cadmium on maize plants. *Arch. Environ. Con. Tox.* **25**, 244-249.
- Robinson JM (1988) Does O₂ photoreduction occur within chloroplasts in vivo? *Physiologia Plantarum* **72**, 666-680.
- Ros R, Cooke DT, Burden RS & James CS (1990) Effect of the herbicide MCPA, and the heavy metals, cadmium and nickel on the lipid composition, Mg²⁺-ATP-ase activity and fluidity of plasma membranes from rice, *Oryza sativa* (cv. Bahia) shoots *Journal of Experimental Botany* **41**, 457-462.
- RoyChoudhury A, Roy C & Sengupta D (2007) Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous lea gene *Rab16A* from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Reports* **26**, 1839-1859.
- Rubio MI, Escrig I, Martínez-Cortina C, López-Benet FJ & Sanz A (1994) Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Regulation* **14**, 151-157.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC & del Rio LA (2001)

- Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2115-2126.
- Sandermann H (2004) *Molecular ecotoxicology: from man-made pollutants to multiple environmental stresses*. In *Molecular Ecotoxicology of Plants (Ecological Studies)*: Springer-Verlag.
- Schachtman DP & Shin R (2007) Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 47-69.
- Seregin IV, Ivanov, V. B. (1998) The transport of cadmium and lead ions through root tissues. *Russian Journal of Plant Physiology* **45**, 780-785.
- Shin R, Berg RH & Schachtman DP (2005) Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1350-1357.
- Shin R & Schachtman DP (2004) Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8827-8832.
- Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 161-167.
- Smeets K, Ruytinx J, Semane B, Van Belleghem F, Remans T, Van Sanden S, Vangronsveld J & Cuypers A (2008) Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* **63**, 1-8.
- Smith GC, Brennan EG & Greenhalgh BJ (1985) Cadmium sensitivity of soybean related to efficiency in iron utilization. *Environmental and Experimental Botany* **25**, 99-106.
- Smith IK (1985) Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiology* **79**, 1044.
- Stiborova M, Ditrichova M & Brezinova A (1987) Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley and maize seedlings. *Biologia Plantarum*, 453-467.
- Suelter CH (1970) Enzymes activated by monovalent cations. *Science* **168**, 789-795.
- Suzuki N, Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V & Mittler R (2005) Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiology* **139**, 1313-1322.
- Szczerba MW, Britto DT & Kronzucker HJ (2009) K⁺ transport in plants: physiology and molecular biology. *Journal of Plant Physiology* **166**, 447-466.
- Tamás L, Huttová J & Žigová Z (1997) Accumulation of stress-proteins in intercellular spaces of barley leaves induced by biotic and abiotic factors. *Biologia Plantarum*

39, 387-394.

- Tanou G, Molassiotis A & Diamantidis G (2009) Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1904-1913.
- Véry A-A & Sentenac H (2003) Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 575-603.
- Vysotskaya LB, Korobova AV & Kudoyarova GR (2008) Abscisic acid accumulation in the roots of nutrient-limited plants: its impact on the differential growth of roots and shoots. *Journal of Plant Physiology* **165**, 1274-1279.
- Wagner GJ (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy* **51**, 173-212.
- Walter MH (1989) The induction of phenylpropanoid biosynthetic enzymes by ultraviolet light or fungal elicitor in cultured parsley cells is overridden by a heat-shock treatment. *Planta* **177**, 1-8.
- Weng X-Y, Zheng C-J, Xu H-X & Sun J-Y (2007) Characteristics of photosynthesis and functions of the water-water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. *Physiologia Plantarum* **131**, 614-621.
- Wintermans JFGM & De Mots A (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta* **109**, 448-453.
- Wojcik M & Tukendorf A (1999) Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **22**, 99-107.
- WP Hurng, HS Lur, CK Liao & Kao C (1994) Role of abscisic acid, ethylene and polyamines in flooding-promoted senescence of tobacco leaves. *Journal of Plant Physiology* **143**, 102.
- Xiong L & Yang Y (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell* **15**, 745-759.
- Zeevaart JAD & Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 439-473.
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW & Song C-P (2001) Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology* **126**, 1438-1448.
- Zhao D, Oosterhuis DM & Bednarz CW (2001) Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. *Photosynthetica* **39**, 103-109.